

SUZANA SILVEIRA KROEFF

**CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ROTAVÍRUS
DE SUÍNOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias (Área de
Concentração em Patologia Veterinária) da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Yasuyoshi Hayashi

Co-orientador: Prof. Dra. Maria Lúcia B.O. RácZ

CURITIBA

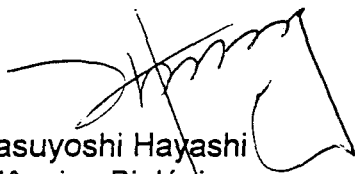
1999

SUZANA SILVEIRA KROEFF

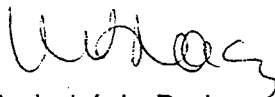
CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Área de Concentração em Patologia Veterinária) da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

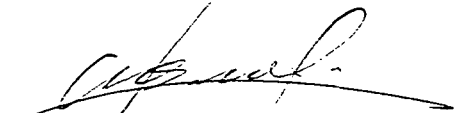
Orientador:



Prof. Dr. Yasuyoshi Hayashi
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Patologia Básica
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Profa. Dra. Maria Lúcia Barbosa de Oliveira Rácz
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia
Universidade de São Paulo -USP



Prof. Dr. Metry Bacila
Setor de Ciências Agrárias
Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Curitiba, 02 de Fevereiro de 1999

À minha família, em especial à minha mãe Amélia e minha vó Alda, que com carinho e dedicação estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, incentivando-me a alcançar meus objetivos e a superar todas as dificuldades.

Ao meu marido Byron, a quem devo toda a gratidão pelo amor que tem me dedicado ao longo dos anos e pela paciência durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Professor Yasuyoshi Hayashi

que durante o transcorrer do curso, mostrou-se seguro e capaz em sua orientação, atencioso, dedicado e sobretudo amigo, conduzindo com habilidade o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Lúcia B. de Oliveira RÁCZ

que com amizade e consideração, incentivou, possibilitou e acompanhou de maneira competente e profissional a realização dessa pesquisa, no Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

AGRADECIMENTOS

Ao finalizar este estudo, gostaria de expressar minha gratidão e estima às seguintes pessoas:

À Maria Beatriz Cardoso de Oliveira, que com amizade fraterna, acolheu-me em São Paulo - SP, tendo ajudado sempre em todas as fases e momentos da realização deste trabalho.

À Veridiana Munford, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo - USP, que, com paciência, simpatia e carinhoso apoio ajudou-me a superar todas as dificuldades no transcurso da execução desta pesquisa.

Ao Dr. Nelson Mores, do Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Concórdia – SC, por Ter gentilmente disponibilizado as amostras que viabilizaram este nosso trabalho.

Às amigas Ivane Müller e Cátia Klein, da EMBRAPA, pelo apoio e suporte incondicional na cidade de Concórdia – SC, durante as visitas ao Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves.

Às amigas Ana Paula, Telma e Thabata, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pelo carinho e companheirismo constantes durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos Professores Metry Bacila e Ivan Deconto, do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná – UFPR, pelos ensinamentos e valiosas sugestões quando da participação como membros da banca do exame de qualificação.

Ao corpo de professores do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, pelos conhecimentos teóricos e práticos que contribuíram, certamente, para a elaboração deste estudo.

À Deleuse Cherobin, secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR, pela atenção dispensada durante todo o período do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivos da pesquisa.....	5
1.1.1 Objetivo Geral.....	5
1.1.2 Objetivos Específicos.....	5
2 REVISÃO DA LITERATURA EM ROTAVÍRUS	7
2.1 Características gerais dos Rotavírus	7
2.2 Nomenclatura.....	7
2.3 Constituição genômica e protéica da partícula viral.....	8
2.4 Composição antigênica.....	14
2.5 Patogenia e transmissão dos rotavírus	18
2.6 Diagnóstico.....	20
2.7 Rotavírus em suínos.....	22
2.8 Vacinas para rotavírus suínos.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Colheita e manutenção das amostras de fezes	36
3.2 Amostras de rotavírus padrão.....	37
3.3 Preparo das suspensões de fezes.....	37
3.4 Triagem das amostras fecais para a presença de rotavírus por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	37
3.4.1 Sensibilização das microplacas	38
3.4.2 Lavagem das microplacas	38
3.4.3 Adição das amostras de fezes	38
3.4.4 Adição da mistura de soros detectores.....	39
3.4.5 Adição do soro conjugado com peroxidase	40
3.4.6 Adição do substrato	40
3.4.7 Leitura e interpretação da reação	40
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	41
3.5.1 Extração do ácido nucléico viral	41
3.5.2 Preparo da placa e do gel de poliacrilamida	42
3.5.3 Coloração do gel com nitrato de prata	43
3.5.4 Secagem do gel.....	44
3.5.5 Fotografia do gel.....	44
3.6 Ultracentrifugação de amostras originais.....	45
3.7 Caracterização sorológica dos rotavírus de acordo com o subgrupo através do ensaio imunoenzimático utilizando anticorpos monoclonais (mAb-ELISA)	45
3.7.1 Sensibilização das microplacas	46

3.7.2 Lavagem das microplacas	46
3.7.3 Bloqueio	46
3.7.4 Adição das suspensões de fezes	47
3.7.5 Adição do soro detector, adição do soro conjugado e adição do substrato.....	47
3.7.6 Leitura e interpretação da reação	47
3.8 Caracterização molecular de genótipos G e P pela técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).....	48
3.8.1 Extração do ácido nucléico viral	48
3.8.2 Desnaturação do ácido nucléico.....	51
3.9 Transcrição reversa seguida por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	52
3.9.1 Transcrição para cDNA e primeira amplificação	52
3.9.2 Segunda amplificação (<i>semi-nested</i> PCR)	53
3.9.3 Eletroforese em gel de agarose.....	54
3.9.4 Interpretação dos resultados	55
4 APRESENTAÇÃO ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	56
4.1 Triagem das amostras fecais para a presença de rotavírus por ensaio imunoenzimático (ELISA)	56
4.2 Caracterização molecular das amostras positivas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	59
4.3 Caracterização sorológica de subgrupo e sorotipo G das amostras positivas por meio de um ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais (mAb-ELISA)	60
4.4 Caracterização molecular de genótipos G e P por RT-PCR	62
4.5 Caracterização sorológica e molecular das amostras positivas para rotavírus.....	67
5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	72
6 CONCLUSÕES	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

LISTA DE FIGURAS

1 - Correspondência entre os segmentos genômicos dos rotavírus e as proteínas virais, com a localização na partícula viral	10
2 - Estrutura tridimensional, mostrando a composição protéica de uma partícula de rotavírus	12
3 - Porcentagem de amostras positivas para rotavírus do Grupo A nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, por meio do Ensaio Imunoenzimático – ELISA	57
4 - Perfis eletroforéticos em gel de poliacrilamida, característicos de rotavírus do grupo A, encontrados em algumas amostras de fezes de suínos provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná	61
5 - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, do dsRNA dos rotavírus de algumas amostras de fezes identificadas em leitões do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, comparadas ao padrão de rotavírus SA11	61
6 - Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G, de algumas amostras de rotavírus suíno isoladas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, através de RT-PCR com <i>primers</i> animais	65
7 - Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G, das amostras 2013 e 2076, através de RT-PCR com <i>primer</i> único G[10]	65
8 - Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G de algumas amostras de rotavírus suíno isoladas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, por RT-PCR com <i>primers</i> humanos	66
9 - Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G, das amostras 2185 e 2173, isoladas na Região de Castro, Paraná, através de RT-PCR com <i>primers</i> humanos para os genótipos G3, G4 e G9	66
10 - Caracterização molecular, de acordo com genótipo P, de algumas amostras de rotavírus suíno, isoladas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, através de RT-PCR com <i>primers</i> animais	68
11 - Caracterização molecular, de acordo com genótipo P, de algumas amostras de rotavírus suíno, isoladas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, através de RT-PCR com <i>primers</i> animais	68

12 - Caracterização molecular, de acordo com o genótipo P, utilizando <i>primers</i> únicos P[6] e P[7]	69
13 - Número total de amostras de rotavírus caracterizadas de acordo com o genótipo G, identificadas por RT-PCR em fezes de suínos dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná	70
14 - Número total de amostras de rotavírus caracterizadas de acordo com o genótipo P, identificadas por RT-PCR em fezes de suínos dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná	71

LISTA DE TABELAS

1. Características dos <i>primers</i> utilizados para o <i>semi-nested</i> RT-PCR, para genotipagem G de rotavírus suínos identificados	49
2. Características dos <i>primers</i> utilizados para o <i>semi-nested</i> RT-PCR, para genotipagem P de rotavírus suínos identificados	50
3. Caracterização de amostras padrão animais, de acordo com os genótipos G e P, com os respectivos segmentos amplificados por RT-PCR	55
4. Caracterização de amostras padrão humanas, de acordo com os genótipos G e P, com os respectivos segmentos amplificados por RT-PCR.....	55
5. Total de amostras de fezes de suínos colhidas no Estado do Rio Grande do Sul e distribuição das amostras positivas para rotavírus, pelo ensaio imunoenzimático, de acordo com os municípios e propriedades – período de junho de 1995 a outubro de 1997.	57
6. Total de amostras de fezes de suínos colhidas no Estado de Santa Catarina e distribuição das amostras positivas para rotavírus, pelo ensaio imunoenzimático, de acordo com os municípios e propriedades – período de junho de 1995 a outubro de 1997.....	58
7. Total de amostras de fezes de suínos colhidas no Estado do Paraná e distribuição das amostras positivas para rotavírus, pelo ensaio imunoenzimático, de acordo com os municípios e propriedades – período de junho de 1995 a outubro de 1997.....	58
8. Número e porcentagem de amostras fecais colhidas e positivas para rotavírus através do ensaio imunoenzimático, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, de acordo com a fase de crescimento dos leitões.....	59
9. Número e porcentagem de amostras de fezes de suínos testadas para detecção de rotavírus, através da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná.....	60
10. Resultados da caracterização sorológica quanto ao subgrupo das amostras identificadas como rotavírus nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná	62

11. Número e porcentagem de genótipos G encontrados em amostras de fezes de suínos dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, pela técnica de RT-PCR	64
12. Número e porcentagem de genótipos P encontrados em amostras de fezes de suínos dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, pela técnica de RT-PCR	67
13. Caracterização das amostras positivas para rotavírus identificadas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, quanto ao subgrupo, genótipo G e genótipo P, utilizando-se <i>primers</i> suínos, bovinos e humanos	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EIARA – Ensaio imunoenzimático para Rotavírus e Adenovírus
ELISA – Ensaio imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay)
MAb – Anticorpo monoclonal
MASTER MIX – Mistura de Reagentes
PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pb – Pares de Base
dsRNA – RNA fita dupla
Kpb – kilopares de bases
kDa – kilo Daltons

RESUMO

O objetivo do estudo foi realizar a caracterização sorológica e molecular em amostras de rotavírus suíno na região Sul do Brasil. Para sua realização, foram colhidas 167 amostras de fezes de suínos nas fases de maternidade e creche em 52 granjas de produção de suínos que apresentavam freqüentes casos de diarreia, em 14 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, durante o período compreendido entre junho de 1995 e outubro de 1997. Todas as amostras foram submetidas a um ensaio imunoenzimático (ELISA) para a detecção de rotavírus do grupo A, das quais 59 (35,33%) foram positivas. Por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi possível revelar a existência de um único eletroferótipo de rotavírus suíno nas regiões estudadas. As amostras positivas foram testadas para a caracterização de subgrupo por meio de um ELISA com anticorpos monoclonais (mAb-ELISA), onde 9 amostras foram específicas para o subgrupo II e 50 não reagiram para nenhum dos subgrupos, sendo classificadas como nãoI-nãoII. Para a caracterização de genótipos G e P utilizou-se a técnica de transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) com *primers* específicos para rotavírus de suínos, bovinos e humanos. As amostras foram caracterizadas como genótipos G3, G4, G5, G9, G10 e P[6], P[7] e misturas de P[6] + P[7] no mesmo animal. Este estudo evidenciou a existência de diferentes genótipos de rotavírus suínos, circulando ao mesmo tempo em uma mesma região e ou em uma mesma granja, incluindo o genótipo G9 que, até o último ano tinha sido encontrado somente em amostras humanas.

ABSTRACT

The objective of this study was to perform the serological and molecular characterization of swine rotavirus samples in the Southern Brazil region. To carry it out, 167 swine feces samples were gathered from animals in the maternity and nursery phases in 53 swine production farms that presented frequent diarrhea cases, in 14 municipalities of the Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná States, during the period between June 1995 and October 1997. All samples were submitted to an enzyme immunosorbent assay (ELISA) for the detection of group A rotavirus, among which 59 (35.33%) were positive. Using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) it was possible to reveal the existence of a single rotavirus electrophorotype in the studied regions. The positive samples were tested for subgroup characterization employing an ELISA with monoclonal antibodies (mAb-ELISA), in which 9 samples were specific for subgroup II and 50 did not react for any of the subgroups, being classified as nãoI-nãoII. The polymerase chain reaction (RT-PCR) was used for G and P genotype characterization, with primers specific to the swine, bovine and human rotavirus. The samples were characterized as genotypes G3, G4, G5, G9, G10 and P[6], P[7] and mixtures of P[6] + P[7] in the same animal. This study evidenced the existence of different swine rotavirus genotypes, circulating at a same moment in a same region and/or in a same farm, including genotype G9 that, up to last year, had only been found in human samples.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui atualmente, um dos maiores rebanhos de suínos do mundo, estando entre os sete detentores da produção mundial, com um plantel estimado em 1997 de 35,8 milhões de cabeças e 2,237 milhões de matrizes, tendo como previsão para 1998 um número aproximado de 36,5 milhões de cabeças e 2,281 milhões de matrizes, segundo o resumo estatístico do setor de suinocultura brasileiro e de dados da Associação Brasileira de Criadores de Suínos - ABCS (MARCANDO, 1998).

Neste contexto, a suinocultura brasileira representa uma nova porta para as exportações no mercado Europeu, uma vez que a tecnologia e o conhecimento no setor e os índices de produtividade da região Sul do Brasil “não ficam aquém aos dos americanos e europeus”, segundo o Presidente da Associação Brasileira dos Exportadores de Carne Suína – ABECS, Sérgio Roberto Waldrich. Ainda segundo esta fonte, a Rússia e a África do Sul são também dois excelentes mercados potenciais para o Brasil, sem contar com Hong Kong, Argentina e Uruguai, que se destacam como compradores de carne suína brasileira. Em termos de exportação brasileira, na região Sul, Santa Catarina é responsável por 61,5% das exportações brasileiras de carne suína e o maior produtor, seguido pelo Rio Grande do Sul que responde por 12,7% da totalidade exportada. (ALMEIDA, 1998).

Entretanto, a suinocultura, como qualquer outro tipo de negócio, está sujeita a fatores de riscos, destacando-se como importantes ao suinocultor os de ordem sanitária na produção de suínos e, principalmente, os que buscam reduzir a mortalidade, refugagem e perdas de leitões na fase de maternidade e de creche,

causadas por diarreias infecciosas e endêmicas. (BOHL, 1979; LECCE et al., 1982; LEMAN et al., 1986; WOODE, 1986; MORES et al., 1991 e ALFIERI et al., 1995b). Em todos os países onde a suinocultura é explorada de forma intensiva o rotavírus representa uma das maiores causas de diarreias infecciosas endêmicas de etiologia viral. (BOHL et al., 1978; LECCE et al., 1982; HOLMES, 1983; LEMAN et al., 1986; FITZGERALD et al., 1988; HALL, 1989; GELBERG, 1989; ALFIERI et al., 1991) apontaram os rotavírus como importantes agentes causadores de diarreias em animais jovens. A fase de creche é um período crítico na produção de leitões na suinocultura intensiva e, segundo WENTZ et al.(1988) no Estado de Santa Catarina as diarreias na maternidade após sete dias são freqüentes, estando o rotavírus entre os agentes infecciosos envolvidos nas diarreias de leitões lactantes. MORES et al. (1995), em estudo recente, afirma que “a taxa de mortalidade média de leitões lactantes nas criações confinadas da região sul do Brasil, varia de 15 a 20%”.

Conforme evidenciado por BOHL et al. (1978) as infecções por rotavírus causam sérios quadros de diarreia neonatais em várias espécies animais, com maior incidência em suínos e bovinos recém nascidos e desmamados. A morbidade das infecções por rotavírus nestas espécies alcança até 80% e a mortalidade pode chegar a 60%. Os rotavírus do grupo A são reconhecidos como causa comum de diarreias em leitões lactentes de 1 a 5 semanas de idade e em leitões desmamados de 3 a 5 semanas (WOODE et al., 1976; BOHL et al., 1978). Em 1978 HOUSE já se referia ao impacto econômico dos rotavírus e de outros agentes infecciosos como causadores de doenças em animais jovens. MEBUS (1982) afirmou, mais especificamente, que as diarreias neonatais e as de pré e pós desmama causam à suinocultura relevantes perdas econômicas, em função da mortalidade de suínos e

do decréscimo da taxa de peso vivo e conversão alimentar.

SVENSMARK et al.(1989a) afirmam que em rebanhos afetados, a taxa de mortalidade pode elevar-se a 4,5 vezes, podendo atingir até 8%, sendo que os leitões necessitam, em média, de 2,3 dias a mais para atingir 25 kg de peso vivo, na saída da creche, o que influencia, diretamente, na produtividade da granja.

MADEC, JOSSE e JESTIN (1986) e SVENSMARK et al.(1989b) deixam claro que, apesar dos agentes infecciosos não causarem mortalidade alta após uma semana de vida, têm influência negativa na performance do animal, refletindo-se no peso das leitegadas (menor que 200 g/dia em 69% dos rebanhos) e no peso do animal ao desmame.

Para GELBERG (1989) em função da variabilidade antigênica dos rotavírus, da resistência do vírus por longos períodos no meio ambiente, da resistência gradual a desinfetantes e da presença de animais portadores assintomáticos, esta virose, uma vez introduzida no plantel, tende a se perpetuar. WOODE (1986) explica que o rotavírus permanece no rebanho sob forma enzoótica, sendo que a taxa de mortalidade no período de surtos pode chegar a 50% dos leitões afetados. Conforme estudo econômico realizado no município de Xanxerê, no Oeste de Santa Catarina, por GIROTTO et al. (1988), num surto de diarreia de leitões em amamentação causado por rotavírus, em granja produtora de matrizes cruzadas, os gastos efetivos correspondiam ao preço de 7,45 reprodutores, acrescidos da perda da receita líquida equivalente a 36 animais reprodutores, *“o que por si só justifica medidas preventivas no sentido de evitar surtos de rotavírus”*.

No Brasil os rotavírus em suínos vêm sendo estudados de maneira mais sistemática, a partir da década de oitenta, destacando-se como importantes

contribuições os trabalhos de SAN JUAN et al.(1986), WENTZ et al.(1988), GATTI et al.(1988, 1989, 1989a, 1989b), FREITAS et al.(1991), BARCELLOS e STEPAN (1991), GOUVEA, NOZAWA e ARAÚJO (1991), BITTENCOURT e RÁCZ (1992), GATTI et al.(1993), ALFIERI et al.(1994), ALFIERI et al. (1995a, 1995b) e MORES et al. (1995).

Até o momento, entretanto, são poucos os estudos mais específicos realizados no sentido da caracterização sorológica e molecular de rotavírus em suínos na região sul do Brasil. Cabe destacar os trabalhos recentes de ALFIERI et al. (1998) e LIMA et al. (1998). Para tanto, é necessário que sejam estudadas as amostras identificadas nesta região, em termos de subgrupos e sorotipos.

Convém ressaltar que estudos dessa natureza revestem-se de importância crescente para o setor de suinocultura brasileira, na medida em que a caracterização sorológica e molecular desse vírus subsidiará novos conhecimentos para o desenvolvimento de vacinas mais específicas, que possuam um espectro de proteção mais adequado as características antigênicas dos isolados de campo, ao mesmo tempo em que subsidiará informações que podem conduzir à implantação preventiva de programas de vacinas no país, contribuindo não só para o aumento da produção brasileira de suínos como para o respectivo aumento de ganhos econômicos e de competitividade da suinocultura brasileira no panorama globalizado mundial.

Cabe salientar que a importância da geração de novos conhecimentos e a respectiva aplicação em medidas de controle e desenvolvimento de vacinas mais específicas para esse vírus já foi evidenciada em estudos anteriores, principalmente nos de HALL, JONES, MORGAN (1992), SNODGRASS (1995) e BRITO (1997).

1.1 OBJETIVOS DA PESQUISA

Diante dessas considerações, são os seguintes os objetivos de pesquisa:

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização sorológica e molecular de rotavírus de suínos na Região Sul do Brasil

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a ocorrência de rotavírus em suínos de 1 a 60 dias de idade, na Região Sul do Brasil, em granjas que apresentem casos de gastroenterite aguda, por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA).
- Caracterizar por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), os genomas dos rotavírus suínos identificados.
- Caracterizar sorologicamente (grupo e subgrupo), por meio de ensaios imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais (mAb-ELISA), os rotavírus suínos identificados.

- Caracterizar molecularmente os genótipos G e P dos rotavírus suínos identificados por meio da técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

2 REVISÃO DE LITERATURA EM ROTAVÍRUS

Nesta parte apresenta-se a fundamentação teórico – empírica sobre rotavírus , no que se refere às características básicas e específicas e ao diagnóstico, de forma geral, e ao enfoque voltado para suínos, de maneira específica.

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ROTAVÍRUS

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae* e ao gênero *Rotavirus*, conforme o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus – ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses, (FENNER, 1976 e FRANCK et al., 1991), sendo que o nome foi proposto por FLEWETT et al. (1974), devido à semelhança morfológica da partícula viral com uma roda com raios curtos e um aro liso externo bem definido (em latim “rota”). Segundo MURPHY et al. (1995), esta classificação é mantida até o momento atual.

Conforme KAPIKIAN e CHANOCK (1996), ainda referente ao sentido morfológico, os rotavírus são partículas icosaédricas não envelopadas medindo aproximadamente 75 nm de diâmetro, com tripla camada protéica, composta de um capsídeo externo, um interno e um “core” que envolve o material genético constituído por 11 segmentos de RNA dupla fita (dsRNA).

2.2 NOMENCLATURA

A nomenclatura adotada seguiu a proposta de ESTES e COHEN (1989), pela qual as amostras de rotavírus animais devem conter a abreviação da espécie animal que deu origem à amostra, seguida do nome da amostra isolada.

Para a espécie suína utilizou-se a abreviatura Po; para Bovina, Bo; Símia, Si; Equina, Eq; Felina, Fe; Coelho, La; Galinha, Ch; Pombo, Pi; Perú, Tu; Canina, Ca e Murina, Mu.

Para a espécie humana a regra estabeleceu que não é necessário usar a sigla da espécie, apenas o nome da amostra estabelecido pelo laboratório onde foi isolada.

2.3 CONSTITUIÇÃO GENÔMICA E PROTÉICA DA PARTÍCULA VIRAL

O genoma dos rotavírus está contido no “core” do capsídeo viral e está constituído por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA). Segundo KAPAHUKE et al., 1986, as partículas de rotavírus contêm sua própria RNA polimerase RNA-dependente, que é responsável pela transcrição dos segmentos de RNA individuais em RNAs mensageiros. O tamanho do genoma é de aproximadamente 18 K pares de bases (Kpb), com pesos moleculares que variam de $0,2 \times 10^6$ daltons (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). O tamanho dos segmentos genômicos variam e estes são numerados de 1 a 11, de acordo com a migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), sendo o segmento 1, o maior, com 3.302 pb e o segmento 11, o menor, com 667 pb (PEREIRA et al., 1983, PEDLEY et al., 1983, 1986, GOMBOLD e RAMIG, 1994).

De acordo com o perfil de migração dos segmentos do dsRNA em PAGE os rotavírus foram classificados em 7 grupos sorológicos que correspondem a 7 eletroferogrupos diferentes, denominados de A a G (RODGER et al., 1981, ESTES, GRAHAM, DIMINOV, 1984, DESSELBERGER, 1989).

O padrão eletroforético de migração do gel de poliacrilamida ou eletroferótipo característico dos rotavírus do grupo A é distribuído em classes ou regiões de diferentes pesos moleculares, da seguinte forma: Segmentos 1,2,3 e 4 na Classe I; segmentos 5 e 6 na Classe II; segmentos 7,8 e 9 na Classe III e segmentos 10 e 11 na Classe IV (LOURENÇO et al., 1981).

As amostras de rotavírus que apresentam outros tipos de padrão eletroforético, distinto daquele descrito para o Grupo A, podem ser consideradas como amostras do Grupo A com rearranjo genômico ou como amostras de rotavírus não-A (SAIF e THEIL, 1985, BRIDGER, 1987, McCRAE, 1987, SAIF, 1990).

Os rotavírus que pertencem ao eletroferogrupo A apresentaram os segmentos 7,8 e 9 com peso molecular muito próximo, formando um “triplet” ou trinca, o que os diferenciou dos rotavírus dos grupos não-A (PEDLEY et al., 1983, 1986, SAIF e THEIL, 1985, TODD E McNULTY, 1976, McCRAE, 1987, SAIF, 1990).

De acordo com SAIF e JIANG, 1994, apesar da PAGE ser uma técnica simples e prática para o uso na detecção e caracterização de amostras de rotavírus, a análise dos perfis eletroforéticos não poderia ser utilizada como único critério para classificação dos grupos de rotavírus, visto que foram encontradas amostras de rotavírus suínos que pertenciam a dois grupos diferentes, B e E, que possuíam eletroferótipos semelhantes, mas características antigênicas distintas.

Cada um dos 11 segmentos do dsRNA codifica para pelo menos uma proteína, sendo seis estruturais e cinco não estruturais (PORTERFIELD, 1989, ESTES, 1996). A figura 1 apresenta a localização das proteínas virais, bem como segmentos genômicos que as codificam.

As proteínas estruturais foram designadas VP, do inglês "*Viral Protein*", seguida por número seqüencial na ordem decrescente de peso molecular (ESTES e COHEN, 1989). As proteínas estruturais foram distribuídas pela partícula viral em proteínas do "core", VP1 (125 KDa), VP2 (94 KDa) e VP3 (88 KDa); proteína do capsídeo interno, VP6 (46 KDa) e proteínas externas, VP4 (88KDa) e VP7 (38 KDa) (BRIDGER, 1987, ESTES E COHEN, 1989, PAUL e LYOO, 1993, YEAGER et al., 1994). As proteínas não estruturais, encontradas nas células infectadas e nas partículas virais maduras, são: NSP1 (NS53), NSP2 (NS35), NSP3 (NS34) e NSP4 (NS28).

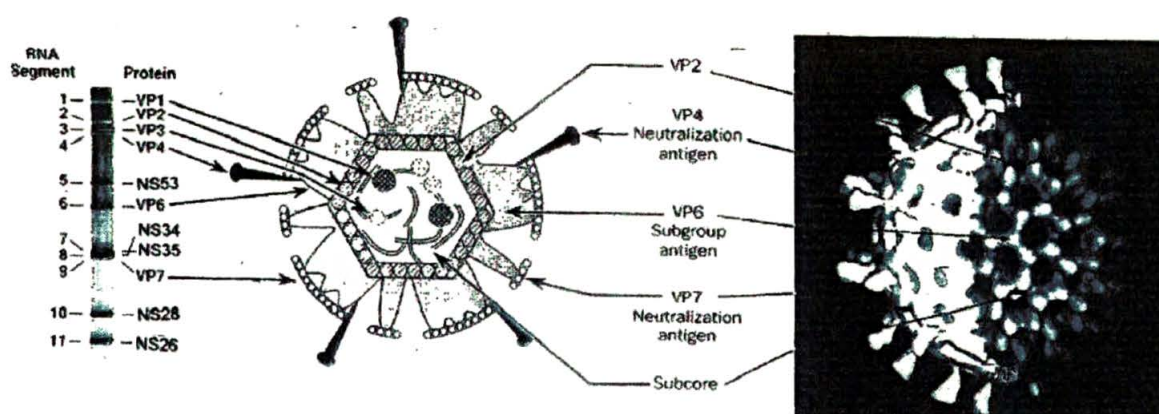


FIGURA 1 - CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS SEGMENTOS GENÔMICOS DOS ROTAVÍRUS E AS PROTEÍNAS VIRAIS E SUA LOCALIZAÇÃO NA PARTÍCULA VIRAL, SEGUNDO CONNER, MATSON, ESTES, 1994.

Embora os produtos de todos os genes dos rotavírus sejam reconhecidos como antígenos pelo sistema imune, as proteínas VP4, VP6 e VP7 se constituem nos principais sítios antigênicos, induzindo a produção de anticorpos, sendo consideradas como componentes importantes para o desenvolvimento de vacinas (PALOMBO, BISHOP, COTTON, 1993, HOSHINO e KAPIKIAN, 1994).

A VP7 é uma glicoproteína codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do genoma dos rotavírus, dependendo da cepa viral (ESTES e COHEN, 1989).

Esta glicoproteína é considerada a proteína “major” (principal) do capsídeo externo, por ser a mais abundante, constituindo cerca de 30% do vírion e apresentando um papel importante na indução da produção de anticorpos neutralizantes, que estão diretamente relacionados com infecção por rotavírus (HOSHINO et al., 1985, TANIGUCHI et al., 1985).

De acordo com MATSUI, MACROW, GREENBERG, 1989, a caracterização dos rotavírus em sorotipos foi baseada em determinantes antigênicos presentes na VP7, que reagiam na presença de anticorpos monoclonais específicos.

Pode-se observar, na figura 2 que a VP7 constitui a base da camada externa da partícula viral, de onde projetam-se as espículas protéicas formadas pela proteína VP4, que atravessa a camada da VP7 e interage com a proteína VP6, da camada intermediária.

A proteína VP4 é o componente “minor” do capsídeo externo, codificada pelo segmento 4 do dsRNA, constituindo cerca de 1,5% da proteína total do vírion (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). As moléculas de VP4 ficam organizadas na forma de espículas no vírion. Estudos realizados por BOTH, BELLAMY, MITCHELL (1994) e PRASAD e CHIU (1994) relataram que a VP4 está associada a algumas funções importantes, como a indução de anticorpos neutralizantes, a aglutinação de hemácias, o aumento de infectividade do vírion após a clivagem proteolítica e a entrada do vírus na célula.

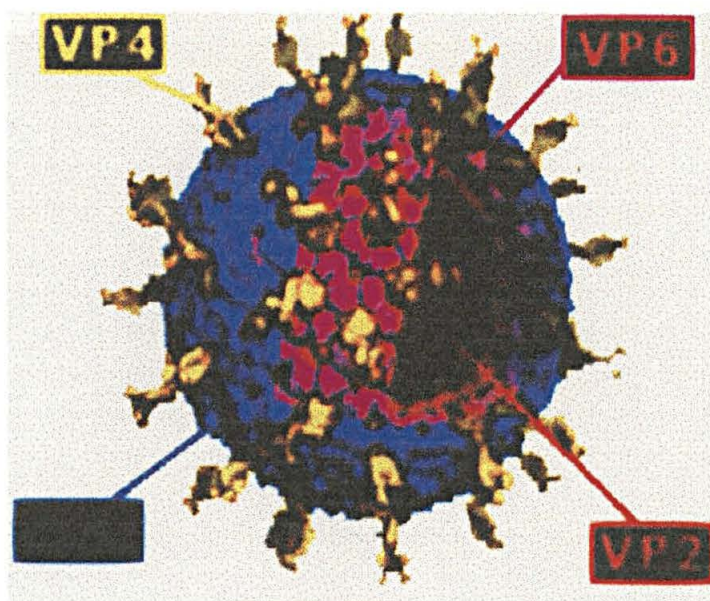


FIGURA 2 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL MOSTRANDO A COMPOSIÇÃO PROTEICA (VP2, VP4, VP6 E VP7) DE UMA PARTÍCULA DE ROTAVÍRUS.

Alguns autores como HOSHINO et al. (1985), GENTSCH et al. (1992), KAPIKIAN e CHANOCK (1996) relataram a participação da VP4 no processo de neutralização da infectividade dos rotavírus, destacando a importância da sua caracterização para a sorotipagem e genotipagem de amostras de rotavírus do Grupo A. Ainda segundo estes autores, a identificação do sorotipo VP4, específico de rotavírus, mostrou estar diretamente relacionada com estudos de epidemiologia molecular das rotavíroses, bem como com o desenvolvimento de vacinas eficientes.

O capsídeo interno dos rotavírus é composto por uma camada contínua de moléculas da proteína VP6, codificada pelo segmento 6 do genoma viral, constituindo 51% do vírion.

A proteína VP6 é a mais abundante dos rotavírus, desempenhando um importante papel estrutural por interagir com as proteínas VP4 e VP7 do capsídeo

externo e com a VP2 do “core”. Essa proteína também é conhecida como proteína grupo-específica, por ter apresentado epítopes comuns a todos os rotavírus de um determinado grupo, o que a tornou o antígeno de escolha para os testes sorológicos de diagnóstico (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

As amostras de um mesmo sorogrupo, indistintamente da espécie de origem, possuem um antígeno comum, sendo este antigenicamente distinto entre os sorogrupos (SAIF e THEIL, 1985, BRIDGER, 1987, SAIF, 1990).

Segundo KAPIKIAN et al. (1981) e ESTES e COHEN (1989), a proteína VP6 para os rotavírus do Grupo A apresentou epítopes diferenciados que permitiram a caracterização das amostras em subgrupos, por meio de ensaios imunoenzimáticos.

As proteínas VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos genômicos 1, 2 e 3 respectivamente, formam o “core” dos rotavírus.

A VP1 é uma proteína estrutural de 124 kDa e participa no processo de replicação viral, apresentando semelhanças com RNA polimerases (ESTES e COHEN, 1989).

Segundo estes mesmos autores, a VP2 tem sido apontada como essencial para a replicação do RNA ou para a maturação da partícula viral.

Outra proteína estrutural, a VP3, de 98 kDa, foi descrita interagindo com outras proteínas, com atividade de transcriptase (ESTES, 1996a).

Na década de 80 as proteínas não estruturais, encontradas em células infectadas e não no vírion, foram denominadas de NS, do inglês “*Non Structural*”, seguidas pelo peso molecular.

Na década de 90 as iniciais NS foram substituídas por NSP (*Non Structural Proteins*), seguidas de um número para facilitar a comparação entre as cepas de

vírus (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

A proteína NSP1 (NS53) é codificada pelo segmento 5 do dsRNA, sendo encontrada nos estágios iniciais da maturação viral.

A proteína NSP2 (NS35) é codificada por um dos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da cepa viral, tendo sido detectada durante as últimas etapas da maturação viral associada ao *core*.

A proteína NSP3 (NS34) foi relacionada com a replicação viral, sendo encontrada em partículas sub-virais.

A glicoproteína NSP4 (NS28) é codificada pelo segmento 10, estando relacionada com a montagem da partícula viral.

2.4 COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA

Do ponto de vista antigênico os rotavírus foram classificados em grupos, subgrupos e genótipos (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). Segundo os estudos nesta área, foram caracterizados 7 grupos distintos de rotavírus, denominados de A a G, baseados nos determinantes antigênicos presentes na proteína de capsídeo VP6 (ESTES e COHEN, 1989).

Os rotavírus do grupo A são os mais freqüentes e importantes agentes etiológicos de diarreias severas em recém-nascidos e crianças, sendo responsáveis por 870.000 mortes anuais em países desenvolvidos (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). Esse grupo também é o principal responsável pelo aparecimento de diarreias em animais domésticos, sendo o antígeno de grupo A detectado pela maioria das técnicas sorológicas conhecidas (JEREZ et al., 1987, KASSUBA, SAIF, GREEMBERG, 1990, CORNAGLIA, ELAZHARY, TALBOT, 1993).

Os rotavírus do grupo B já foram identificados em suínos (BRIDGER, 1987, GATTI et al., 1989), bovinos, caprinos e humanos (BRIDGER, 1987). Os rotavírus do grupo C foram identificados em suínos e humanos (BRIDGER, 1987, GOUVEA, NOZAWA, ARAÚJO, 1991) com diarreia severa. A constatação de baixa prevalência de anticorpos para o grupo C em humanos (BRIDGER et al., 1986, SAIF, 1989) e a alta prevalência em suínos (SAIF, 1989, TERRETT et al., 1987) tem sugerido que os rotavírus do grupo C são transmitidos do suíno para o homem como uma zoonose (GOUVEA, NOZAWA, ARAÚJO, 1991). Autores sugerem a existência de um ancestral comum ou uma recombinação ocorrida naturalmente em rotavírus de suínos e humanos (URASAWA et al., 1992).

As infecções pelos rotavírus do grupo C são clinicamente mais severas que as do grupo A, até então relatadas (GRICE et al., 1994).

Os rotavírus dos grupos D, E, F e G foram identificados em aves, sendo que o vírus do grupo E foi também identificado em suínos (BRIDGER, 1987). Os rotavírus do sorogrupo A e os do sorogrupo não-A (B a G) podem ser detectados imunologicamente através de antígenos grupo específicos e também por técnicas de hibridização molecular (PAUL e LYOO, 1993) e amplificação gênica (PCR) (GOUVEA et al, 1990a; USHIJIMA et al., 1992; ISEGAWA et al., 1993).

As classificações sorológicas de subgrupo e sorotipos estão estabelecidas apenas para os rotavírus do grupo A. Foram definidos, com base em determinantes antigênicos da proteína VP6, quatro subgrupos de rotavírus do grupo A designados de subgrupo I, subgrupo II, subgrupo I e II e subgrupo nãoI-nãoII (ESTES e COHEN, 1989, LOPEZ, DESSELBERG, McCRAE, 1994, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

O subgrupo I tem sido freqüentemente encontrado em animais, tendo sido relatado em bovinos e suínos (amostra Po/Ym). Algumas amostras de rotavírus eqüinos, como a Eq/F1-14 e Eq/H-2, foram descritas como representantes dos subgrupos I e II e subgrupo nãoI-nãoII. A amostra Mu/Edim de rotavírus também foi caracterizada como subgrupo nãoI-nãoII (HOSHINO et al., 1987, LIPRANDI et al., 1990, COSTA MENDES et al., 1993).

Segundo relato de HOSHINO e KAPIKIAN (1994), o subgrupo II tem sido o mais comumente encontrado em humanos e o subgrupo não-I-não-II em aves. Ainda neste sentido, foi relatada uma amostra de rotavírus bovino (Bo/993/83), semelhante a rotavírus aviário, que não apresentava especificidade para subgrupo I ou II (ISEGAWA et al., 1994, BRUSSOW et al., 1992).

GREENBERG et al. (1983b) relataram a ocorrência de amostras suínas e eqüinas que reagiam com anticorpos monoclonais para o subgrupo II.

Inicialmente as técnicas utilizadas para a identificação dos epítomos de subgrupo eram o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a hemaglutinação (KAPIKIAN et al., 1981, YOLKEN et al., 1978). A partir de 1983, GREENBERG et al. (1983a) descreveram dois anticorpos monoclonais (MAbs), um que reagia especificamente com o subgrupo I (MAb 255/60) e outro específico de subgrupo II (MAb 631/9). Estes MAbs têm sido amplamente usados para a caracterização de amostras de rotavírus animais e humanos em estudos epidemiológicos (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996, STEELE et al., 1998). Outros MAbs diretos contra VP6 também já foram relatados (TANIGUCHI et al., 1984, LIPRANDI et al., 1990).

A especificidade para sorotipo/genótipo dos rotavírus do grupo A é determinada pelas proteínas VP4 e VP7, que são codificadas por diferentes

segmentos genômicos e que induzem a produção de anticorpos neutralizantes de forma independente. Por esta razão, tornou-se necessária a utilização de um sistema binário de nomenclatura em que fossem consideradas as especificidades tanto para VP7 como para VP4 (HOSHINO et al., 1985, OFFIT et al., 1986, ESTES e COHEN, 1989).

No sentido de padronização da literatura, os sorotipos específicos VP7 foram denominados "G", por ser esta uma glicoproteína e, para os sorotipos VP4 deu-se a denominação "P", em função de a VP4 ser sensível à protease (ESTES e COHEN, 1989).

A técnica de neutralização cruzada com anticorpos policlonais ou monoclonais tem sido utilizada para a identificação dos sorotipos de rotavírus, enquanto que os genótipos foram determinados por métodos moleculares (GORZIGLIA et al., 1990b, GOUVEA et al., 1990a, USHIJIMA et al., 1992, GENTSCH et al., 1996).

ESTES (1996a) demonstrou que havia completa correlação entre sorotipo e genótipo da VP7, o que permitiu a utilização da expressão "Tipo G" para ambos. Entretanto, para a VP4, a correlação entre genótipo e sorotipo ainda não foi bem definida, devendo-se considerar se a técnica utilizada para a caracterização foi sorológica ou molecular (GORZIGLIA et al., 1988, 1990a, 1990b, ESTES e COHEN, 1989). ESTES (1996) recomenda que, para os sorotipos P, seja utilizado o prefixo P seguido do número do sorotipo, e no caso de genótipo, o número deve estar entre colchetes.

Os sorotipos G podem ser definidos pela reação de neutralização da infectividade, usando a técnica de redução de placas, pela reação de neutralização de focos fluorescentes em culturas celulares, pelo ensaio imunoenzimático com

anticorpos monoclonais ou por reação em cadeia da polimerase e por seqüenciamento de genes da proteína VP7 (GOUVEA et al., 1990a, ISEGAWA et al., 1993).

Até o momento foram descritos 14 sorotipos G de rotavírus do grupo A, denominados de G1 a G14, sendo os tipos G1, G2, G3 e G4 encontrados com maior freqüência em humanos com quadros de diarreias, tem sido considerados importantes epidemiologicamente (WHITE et al., 1991). Diversos genótipos G (G3, G4, G5 e G11) e P (P[6] e P[7]) de rotavírus tem sido caracterizados em suínos (BOHL, THEIL, SAIF, 1984, THEIL, 1990, SAIF, ROSSEN, PARWANI, 1994). O sorotipo G1 também já foi relatado em suínos e bovinos. Os sorotipos G8 e G12 foram descritos em humanos, ocorrendo raramente (GREEN, HOSHINO, IKEGAMI, 1989, GERNA et al., 1990).

O sorotipo G7 foi identificado em aves (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994) e mais recentemente em uma amostra de bovinos. O sorotipo G11 tem sido encontrado predominantemente em suínos (RUIZ et al., 1988, HOSHINO e KAPIKIAN, 1994, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996, TIMENETSKY et al., 1997) e os sorotipos G13 e G14 foram descritos exclusivamente em eqüinos (BROWNING et al., 1991, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

Quanto à caracterização sorológica, baseada na proteína VP4, ainda não foi encontrada uma relação entre os resultados da sorotipagem e da genotipagem das amostras.

2.5 PATOGENIA E TRANSMISSÃO DOS ROTAVÍRUS

A infecção por rotavírus ocorre através da via oral, quando o animal ingere

fezes ou alimentos contaminados, sendo que estes vírus tem um tropismo especial por células epiteliais do topo das vilosidades do intestino delgado, principalmente as do jejuno e íleo (SOBESTIANSKY et al., 1993).

O fato de os rotavírus serem resistentes à inativação e apresentarem estabilidade à temperatura ambiente, resistindo por 7 a 9 meses entre 18 e 20°C (FLEWETT, BRYDEN, DAVIES, 1995), contribui com sua transmissão (ESTES et al., 1979). Além disso, os rotavírus podem ser eliminados nas fezes em grande concentração, podendo atingir cerca de 10^{11} partículas virais por grama de fezes (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

Nos enterócitos o vírus faz replicação, causando a destruição dessas células. A partir do processo de replicação, novas partículas virais são liberadas, infectando outras células ou sendo eliminadas pelas fezes. A penetração dos rotavírus através da membrana plasmática dos enterócitos é facilitada em função da proteína VP4 que compõe o capsídeo externo do vírus e que possui atividade de hemaglutinina (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). Foram observadas alterações patológicas, incluindo atrofia das vilosidades, hipertrofia das criptas e infiltração de células mononucleares da lâmina própria (SUZUKI e KONNO, 1975, PHILLIPS, 1981, 1989).

As revisões de literatura de FLEWETT e WOODE (1978), ESTES, PALMER e OBIJESKI (1983) e BRIDGER (1988) são fontes que complementam os pontos anteriormente descritos.

2.6 DIAGNÓSTICO

Em função da dificuldade encontrada inicialmente no cultivo, foram desenvolvidas técnicas de diagnóstico que permitiram a detecção dos rotavírus diretamente nas fezes. Entre elas está a microscopia eletrônica (ME), que permitiu a detecção de partículas de rotavírus, pela primeira vez, em seções do epitélio intestinal, na Austrália (BISHOP et al., 1973). Apesar de a ME ter boa sensibilidade e ser relativamente rápida, possui custo elevado, o que limita o seu uso quando o número de amostras é muito grande (ELLENS et al., 1978).

Outras técnicas também foram desenvolvidas, como a imunomicroscopia eletrônica (IME)(BRIDGER e WOODE, 1975, BRANDT et al., 1981), o ensaio imunoenzimático (ELISA)(ELLENS et al., 1978, YOLKEN et al., 1978, PEREIRA et al., 1985), a imunofluorescência (IF)(CANDEIAS et al., 1980), o radioimunoensaio (KALICA et al., 1977), a contraimunoeletroforese (CANDEIAS, ROSEMBURG, RÁCZ, 1978, DAGENAIIS et al., 1980), a coaglutinação (HERBERT et al., 1981, KANG, NAGARAJA, NEWMAN, 1984; DURIGON et al., 1991), a aglutinação em látex (SANEKATA et al., 1991) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)(LOURENÇO et al., 1981, PEREIRA et al., 1983).

Os ensaios imunoenzimáticos têm sido uma das técnicas mais utilizadas para a detecção dos rotavírus, por possuírem alta sensibilidade e especificidade, além de poderem ser automatizadas. O fato de existirem no mercado *kits* comerciais de ELISA viabilizou a utilização da técnica em vários laboratórios de diagnóstico (PEREIRA et al., 1985). Os ELISA's também foram utilizados para a caracterização sorológica de subgrupo e sorotipo de amostras de rotavírus do grupo A, com a utilização de anticorpos monoclonais (BEARDS et al., 1984, TANIGUCHI et al.,

1987, BELLINZONI et al., 1989, URASAWA et al., 1989, GOUVEA et al., 1990b, CORNAGLIA, ELAZHARY e TALBOT, 1993, COULSON et al., 1993).

A PAGE tem sido muito utilizada para o diagnóstico dos rotavírus pela análise do genoma composto de 11 segmentos de dsRNA (PEREIRA et al., 1983, KALICA et al., 1978, HOULY et al., 1986). Através da análise do padrão eletroforético foi possível identificar e diferenciar amostras virais circulando em diferentes regiões e épocas do ano e fazer a determinação da origem de surtos de diarreias causadas por rotavírus (ESTES, GRAHAM, DIMINOV, 1984, GERNA et al., 1987, BITTENCOURT e RÁCZ, 1992, GLASS et al., 1996). Essa técnica ainda permite a identificação dos rotavírus do grupo não-A, uma vez que a produção de reagentes para os grupos B-G ainda é feita em pequena escala (GATTI et al., 1989, SAIF e JIANG, 1994).

TSUNEMITSU, JIANG, SAIF (1992) detectaram rotavírus do grupo C em suínos, bovinos e humanos, utilizando ELISA em todas as amostras de fezes. Os resultados sugerem que o ELISA pode ser utilizado para detectar rotavírus em animais e humanos.

Na década de 90, com o surgimento das técnicas moleculares, várias metodologias foram descritas para identificar ou caracterizar os rotavírus, entre elas a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), que permitiu a caracterização dos rotavírus com base nos genes que codificam a VP7 (genótipo G) e a VP4 (genótipo P)(GOUVEA et al., 1990a, GENTSCH et al., 1992, GOUVEA et al., 1994a,b). Segundo GOUVEA et al. (1990b), WILDE, EIDEN, YOLKEN (1990), XU, HARBOUR, McCRAE (1990) e BUESA et al. (1996), a técnica de PCR mostrou ser 100.000 vezes mais sensível do que a PAGE e 5.000 vezes que a hibridização *in*

situ.

SANEKATA et al. (1991) no Japão, desenvolveram um teste de aglutinação em látex para a detecção de rotavírus em amostras de fezes de suínos, onde foi considerado 4 vezes mais sensível do que a microscopia eletrônica. Eles consideraram esta técnica válida para ser usada para um diagnóstico rápido de rotavírus.

2.7 ROTAVÍRUS EM SUÍNOS

O primeiro isolamento de rotavírus de suínos foi realizado por WOODE et al. (1975). Desde então, vários trabalhos foram publicados, contendo estudos epidemiológicos sobre este vírus. Ainda em estudo de WOODE (1976) foi indicada a existência de um antígeno de grupo comum a todos os rotavírus, localizado no core viral, que podia ser detectado por ensaios imunoenzimáticos.

Alguns autores, no início da década de 80, constataram que a ocorrência de infecções simultâneas por rotavírus e *E. coli* era bastante freqüente em suínos (TZIPORI et al., 1980; LECCE, BALSBAUGH, KING, 1981).

Os estudos com rotavírus suínos têm evoluído rapidamente em todo o mundo. Estudos desenvolvidos por BOHL et al. (1982) sugeriram a existência de vírus com o mesmo tipo de morfologia dos rotavírus suínos mas que possuíam um padrão de migração eletroforético diferente daquele até então descrito, sendo denominados pararotavírus.

A partir de estudos sorológicos e do ácido nucléico de amostras de rotavírus com e sem o antígeno comum de grupo os rotavírus foram classificados em grupos distintos: A, B, C, D e E (PEDLEY et al., 1983, SNODGRASS et al., 1984a, PEDLEY

et al., 1986). SNODGRASS et al. (1984b) descreveram a presença de rotavírus atípicos caracterizados como vírus do grupo B por PAGE, em diferentes espécies animais, inclusive em suínos. Nesta mesma época foram realizados outros relatos da ocorrência de rotavírus atípicos em suínos de vários lugares distintos (BRIDGER, 1980, SAIF et al., 1980, BRIDGER, CLARKE, McCRAE, 1982, THEIL et al., 1985).

Os estudos de SORRENTINO et al. (1986), BELLINZONI et al. (1987) NAGESHA et al. (1988), FU et al. (1989), MORIN, MAGAR, ROBINSON (1990), JANKE et al. (1990), RUIZ, ARRIAGA, MORILLA (1990) também detectaram rotavírus atípicos em suínos.

MORILLA e colaboradores (1991) estudaram especificamente a associação entre o aparecimento de diarreias com a detecção de rotavírus do grupo A e dos rotavírus atípicos dos grupos B e E, em leitões lactentes, sendo possível concluir que estes três grupos de rotavírus podem coexistir em uma mesma criação, sendo que o grupo A mostrou ser o mais prevalente como a causa de diarreia na maioria dos suínos afetados.

Neste mesmo ano, MAGAR, ROBINSON, MORIN (1991) identificaram rotavírus atípicos em surtos de diarreia no pré e pós desmame em suínos. WILL et al. (1994) identificaram 96 amostras positivas para rotavírus suínos, de um total de 1048 amostras estudadas, onde 6 eram do grupo B, 5 do grupo C e as demais 89% do grupo A.

Estudos epidemiológicos dos rotavírus suínos foram também desenvolvidos na Venezuela por UTRERA et al. (1984). Nessa mesma linha de pesquisa, em 1987, ATTI, OJEH e DUROJAIYE, detectaram a presença de rotavírus em leitões na Nigéria, e BERRIOS et al., 1989, detectaram rotavírus em suínos no Chile.

Estudos sobre a prevalência de rotavírus usando a técnica de ELISA foram realizados por JOERGENSSEN, ODIAWO, HALLIWELL em 1990, onde, em um total de 662 amostras de fezes de suínos analisadas, 217 (33%) foram positivas.

DRIESEN, CARLAND e FAHY (1993) estudando as causas e os fatores de risco envolvidos nas diarreias de leitões no pré-desmame na Austrália, detectaram o *Isospora suis*, *Escherichia coli* e os rotavírus em 53,8%, 18,2% e 16,9% das amostras analisadas, respectivamente.

SESTAK e MUSILOVA (1994) na Checoslováquia, detectaram a ocorrência de rotavírus em fezes de leitões com diarreia de amostras coletadas entre 1991 e 1992, utilizando as técnicas de imunofluorescência, microscopia eletrônica, PAGE, imunoperoxidase e ELISA.

A prevalência dos rotavírus em bovinos, suínos, ovelhas e cabras, com e sem diarreia, foi avaliada em estudo realizado por KAMINJOLO e ADESIYUM em 1994, na Ilha de Trinidad e Tobago, pela utilização da técnica de aglutinação em látex. De um total de 470 animais analisados, 138 foram positivos para rotavírus. Nos suínos a taxa de prevalência encontrada foi de 27,8%, sendo que os leitões entre 2 e 8 semanas de idade foram os mais atingidos. Para os animais com diarreia a prevalência foi elevada, atingindo 39,9%. Estas taxas elevadas indicam que os rotavírus podem ser importantes causas de diarreias em animais de importância econômica em Trinidad e Tobago.

GEYER et al. (1995) desenvolveram um projeto para monitoramento da epidemiologia das infecções por rotavírus em leitões com diarreia da África do Sul. As amostras de fezes foram colhidas a cada 2 meses de leitões com menos de 6 semanas de idade no período de um ano. O ELISA detectou um percentual de 24%

de positivos e a PAGE mostrou a presença de 4 tipos diferentes de rotavírus do grupo A circulando na granja.

PUERTO et al. (1996) classificaram amostras de rotavírus isoladas de suínos do estado de Yucatán, no México, quanto ao subgrupo e ao sorotipo. Por meio do ELISA com anticorpos monoclonais específicos, das 74 amostras positivas para rotavírus (26%), foram determinados o sorogrupo I e II para 24 amostras, sendo que 23 pertenciam ao subgrupo I e uma ao subgrupo II. O sorotipo foi caracterizado em 8 amostras, onde 4 foram reativas para o sorotipo 1 e as outras 4 para o sorotipo 3. Através da PAGE, foi possível observar que 69 amostras pertenciam ao grupo A, 3 ao grupo B, uma ao grupo C e uma amostra mostrou um eletroferótipo misto.

Durante 1994 e 1995, vários trabalhos de biologia molecular dos rotavírus foram desenvolvidos por pesquisadores brasileiros em laboratórios dos Estados Unidos da América.

Com a utilização de técnicas moleculares de hibridização e da reação em cadeia de polimerase (PCR) foi possível fazer a caracterização dos sorotipos/genótipos que ocorriam em amostras de rotavírus humanos e animais. GOUVEA, SANTOS e TIMENETSKY (1994a), descreveram a metodologia da reação em cadeia de polimerase (PCR) para identificar os genótipos P de rotavírus em 8 amostras de fezes de bovinos e 12 amostras de suínos obtidas de surtos de diarreias por rotavírus nos Estados Unidos. Das 20 amostras analisadas, 6 não apresentaram resultados positivos após a transcrição reversa e amplificação por PCR. Nas 8 amostras bovinas foram encontrados os genótipos P[5] (semelhante a UK) e P[11] (semelhante a B223), comuns em bovinos. Em 50% das amostras suínas foi encontrado o genótipo P[7] (semelhante a OSU); em outras 4 amostras

foram descritos genótipos P, originalmente encontrados em amostras bovinas, ocorrendo isolados ou misturados com o genótipo suíno P[6]. O genótipo P[6] não foi encontrado sozinho em nenhuma amostra suína.

Na seqüência, as mesmas autoras GOUVEA, SANTOS e TIMENETSKY (1994b) publicaram resultados obtidos a partir de um *semi-nested* PCR, usado para a genotipagem G em amostras de rotavírus bovinos e suínos. Para a padronização da reação de PCR foram utilizadas algumas amostras padrão animais e humanas, já conhecidas. Oito amostras provenientes de bovinos com diarreia e sete de suínos, coletadas nos Estados Unidos, também foram testadas. Para as amostras bovinas foram descritos os sorotipos convencionais G6 e G10, mas para as amostras suínas vários tipos distintos e não usuais foram encontrados, como G6 e G8.

No Brasil BARCELLOS, GUIZZARDI e FALLAVENA (1980) em trabalho realizado com leitões no Rio Grande do Sul, foi o precursor da idéia de que 40% dos processos diarreicos dos suínos jovens eram de origem viral, em particular os rotavírus. SAN JUAN e colaboradores, em 1985, realizaram estudos em granjas de suínos da região leste do Estado de São Paulo, utilizando as técnicas de PAGE, mostrando uma positividade de 85,7% para rotavírus em suínos de 7 a 35 semanas de idade. ROEHE et al. (1985), neste mesmo ano, avaliando suínos entre 10 e 75 dias de idade em 11 granjas do Estado do Rio Grande do Sul, pela técnica de PAGE, observaram que 10,14% dos animais eram positivos para rotavírus, mas quando comparados com a amostra SA-11, mostravam diferenças antigênicas, concordando com os resultados observados anteriormente por McNULTY (1978) e BRIDGER, CLARKE, McCRAE (1982).

Em 1986, SAN JUAN e outros, ainda usando as mesmas amostras suínas, do trabalho anterior, detectaram a presença de amostras de rotavírus do grupo A e também de rotavírus atípicos (não-A), através da técnica de ELISA e da PAGE. Pela comparação dos perfis eletroforéticos, algumas amostras foram classificadas como rotavírus do grupo B.

No Rio Grande do Sul, ROEHE et al. (1986) utilizou as técnicas de ELISA e PAGE para a detecção de rotavírus suíno a partir de 148 amostras de fezes de leitões com idade entre 0 e 75 dias, com diarreia, sendo que 19,59% das amostras eram positivas pela PAGE. Nem todas as amostras foram positivas pelo ELISA de grupo A, sugerindo a existência de vírus antigenicamente distintos. Outros estudos utilizando as técnicas de PAGE e ELISA foram realizados por BITTENCOURT e CANDEIAS (1986) utilizando 140 amostras de fezes de suínos coletadas em diferentes áreas do Estado de São Paulo, onde foi obtido no total um percentual de 43,57% de positividade para rotavírus do grupo A.

WENTZ et al. (1988) realizou estudos na Região Sul do Brasil, identificando como os agentes etiológicos mais frequentemente envolvidos nas diarreias de leitões lactentes a *Escherichia coli*, os rotavírus e o *Isospora suis*.

Em função dos resultados positivos para rotavírus que vinham sendo obtidos em diversos estados brasileiros, GIROTTO e colaboradores, em 1988, realizaram uma avaliação do custo de um surto de rotavirose em uma granja de suínos localizada no município de Xanxerê, Santa Catarina. O número de leitões mortos devido ao rotavírus foi de 68,25 animais, que correspondeu a 17,81% dos animais nascidos vivos durante o mês em que ocorreu o surto. Vários itens foram considerados para a estimativa dos gastos com a doença, entre eles os custos de

alimentação das fêmeas que permaneceram mais tempo na maternidade, os leitões mortos na creche, os gastos com medicamentos, limpeza e energia elétrica, que na época correspondiam ao preço de 11,18 suínos terminados. Somando-se o que foi efetivamente gasto em função do surto com o que não foi recebido em termos líquidos com a morte de leitões na maternidade e creche, o total de despesas corresponderia ao preço de 43,35 suínos vendidos como reprodutores.

GATTI et al. (1988) analisou por imunoeletromicroscopia (IEM), ELISA e PAGE 92 amostras de fezes diarreicas de suínos coletadas na região de Campinas, São Paulo. As amostras foram testadas para verificar a incidência de rotavírus em diferentes faixas etárias. No total foram obtidas 18 (19,5%) amostras positivas para rotavírus em pelo menos dois dos testes utilizados. Neste estudo, a técnica de PAGE se mostrou mais sensível que os testes de ELISA e IEM na detecção de rotavírus em fezes. A análise do perfil eletroforético mostrou 5 eletroferótipos diferentes, sendo que em uma amostra foi possível a visualização de uma mistura de rotavírus do grupo A e do grupo C.

Um surto de diarreia em uma granja de suínos na região de Campinas, São Paulo, foi descrito por GATTI et al. (1989a), onde foi possível diagnosticar 84,6% de amostras positivas para rotavírus por PAGE e 90,9% pelo teste de ELISA. Uma amostra apresentou o perfil eletroforético característico de rotavírus do grupo B, confirmado por um ELISA específico.

ALFIERI, ALFIERI e RESENDE (1989) analisaram 233 amostras de fezes de suínos com e sem diarreia, coletadas em 8 municípios dos Estados de Santa Catarina, Paraná e Minas Gerais, através das técnicas de PAGE e ELISA. No total foram encontradas 50 (21,5%) amostras positivas por PAGE. Destas, 8 foram

negativas por ELISA, sendo que 5 possuíam um perfil eletroforético diferente do grupo A.

BARCELOS e STEPAN (1991) realizaram levantamento em seis granjas da Grande Porto Alegre e região das Missões, RS, sobre as causas de diarreias em leitões após o desmame. De um total de 613 amostras de fezes de leitões analisadas entre 0 e 14 dias após o desmame, 60 amostras foram positivas para rotavírus através de PAGE. Além dos exames virológicos, foram também realizados exames bacteriológicos e parasitológicos das fezes, tendo sido constatado que as diarreias foram originadas seja pela ação dos rotavírus, da *Escherichia coli* ou dos dois agentes associados.

Objetivando demonstrar a ocorrência de rotavírus e *E. coli* nas fezes de leitões sadios, entre a primeira semana de vida até o pós-desmame, FREITAS et al. (1991) estudou 29 propriedades suinícolas de criação intensiva em 4 municípios do Estado do Paraná e em 7 do Estado de São Paulo. A técnica de PAGE foi utilizada para o diagnóstico dos rotavírus, sendo que um total de 25 amostras foram positivas, encontrando-se 5 eletroferótipos distintos, todos compatíveis com o grupo A de rotavírus.

GOUVEA, NOZAWA e ARAÚJO (1991) analisaram 103 amostras suínas por ELISA e PAGE, obtendo 22 e 23 amostras positivas para rotavírus. Destas, 5 amostras foram isoladas em cultura de células Ma104, com efeito citopático, observado entre 5 e 7 dias após a inoculação. Após cada passagem das amostras na cultura de células foram realizados testes por ME, ELISA e PAGE, para confirmar a presença do rotavírus. Este é um dos poucos trabalhos relatados do cultivo dos rotavírus suínos no Brasil.

BITTENCOURT e RÁCZ (1992) examinaram 140 amostras fecais de suínos, colhidas em 5 municípios distintos do interior de São Paulo. Foram obtidas, no total, 45 amostras positivas para rotavírus do grupo A. A PAGE revelou 4 tipos diferentes de perfil eletroforético. Além disso, a idade dos leitões também foi avaliada e, segundo os autores, na 1ª semana de vida dos animais não foram detectados rotavírus, mas após 15 dias de idade houve um aumento significativo na detecção destes.

GATTI et al. (1993) avaliou a excreção de rotavírus em suínos de 1 a 60 dias de idade, que apresentavam ou não quadros de diarreia, do Estado de São Paulo. Foi observado um total de 25,9% de animais com diarreia e que eram positivos para rotavírus, enquanto que para animais sem diarreia a taxa foi de 15%, mostrando que mesmo sem sinais aparentes da rotavirose o rebanho pode estar contaminado. Em estudo realizado por BRITO et al. (1995) no sudoeste do Paraná, que avaliou a etiologia das diarreias de leitões lactentes, foram encontrados resultados da ocorrência de rotavírus como agente único em 63% dos animais e, quando associado à *E. coli*, a prevalência foi de 60% dos leitões.

ALFIERI et al. (1994) estudou a ocorrência de rotavírus associado a agentes bacterianos e protozoários em um surto de diarreia ocorrido em leitões no período pós-desmame, em uma granja de ciclo completo com 130 matrizes localizada no norte do Paraná. A detecção de rotavírus foi realizada por ELISA e PAGE, em 9 *pools* de amostras de fezes diarreicas, sendo que todas foram negativas para rotavírus por ELISA de grupo A e positivas por PAGE, que apresentavam perfil eletroforético de rotavírus atípico (não-A). Os testes bacteriológicos e para identificação de protozoários também foram positivos para todas as amostras,

mostrando a ocorrência de *E. coli*, *Cryptosporidium parvum* e rotavírus, simultaneamente.

MORES et al. (1995) realizaram estudo ecopatológico sobre problemas em leitões lactentes de criações do Sul do Brasil, o que identificou e quantificou a influência de fatores de risco de ordem ambiental, nutricional e de manejo, na ocorrência de diarreias nestes animais.

Em 1995, ALFIERI e colaboradores quantificaram a ocorrência de diarreias em leitões criados em confinamento em 12 granjas da região Norte do Paraná, desde o nascimento até 21 dias após o desmame, estabelecendo correlação do diagnóstico de rotavírus com a frequência de diarreia e com a presença de fatores de risco responsáveis pelo quadro. A técnica utilizada para a detecção de rotavírus foi a PAGE e os fatores de risco foram analisados através do programa ECOSUI do CNPSA/EMBRAPA. Os rotavírus foram encontrados em 43 (27%) das 159 amostras de fezes colhidas, sendo a maior frequência observada nas amostras da maternidade. Foram detectados rotavírus do grupo A, B e C. Os fatores de risco estiveram presentes com a mesma frequência em granjas que apresentavam muita ou pouca intensidade de diarreia.

ALFIERI et al. (1995a) realizaram estudo que analisou alguns aspectos epidemiológicos da rotavirose suína. Durante 18 meses foram colhidas 546 amostras de fezes de leitões com diarreia, de uma granja de ciclo completo, do município de Pato Branco, Sudoeste do Paraná. Fatores climáticos e o manejo sanitário foram também estudados. Os autores concluíram que os rotavírus estavam presentes nas fezes dos animais independentemente dos índices de diarreia observados em cada lote coincidindo, em alguns casos, o aumento da frequência de

diarréia e o diagnóstico do rotavírus. Não foi possível fazer a observação da influência da variação climática sazonal, em função de que os rotavírus foram detectados em quase todos os meses.

Ainda no ano de 1995, ALFIERI et al. (1995b) descreveram uma reação em cadeia da polimerase (PCR), para diferenciar amostras humanas, suínas e bovinas, quanto aos genes das proteínas VP7 e VP6. Foram usadas treze amostras de fezes de suínos que possuíam perfil eletroforético sugestivo de rotavírus do grupo C, sendo que todas reagiram no PCR para o gene 6.

Mais recentemente, no último ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, realizado em São Lourenço, MG, em novembro de 1998, foram apresentados diversos trabalhos que estudam os rotavírus em suínos. Entre eles, destacam-se três trabalhos realizados no Brasil, que tratam da caracterização molecular de rotavírus suíno. Também os resultados gerais obtidos neste estudo foram apresentados no mesmo evento, inserindo-se no âmbito das pesquisas nacionais que vem sendo desenvolvidas em rotavírus suíno (KROEFF et al., 1998).

ALFIERI et al. (1998) analisaram por RT-PCR 26 amostras de fezes de suínos coletadas na região de Londrina, Paraná, para a identificação dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A. Entre os resultados foram encontradas 38% das amostras pertencendo ao genótipo G5P[7] (semelhante à amostra padrão OSU) e 8% foram caracterizados como G4P[6] (semelhante à amostra padrão Gottfried).

CARUZO et al. (1998) também utilizaram a técnica de RT-PCR para a caracterização molecular de amostras de rotavírus suíno quanto ao genótipo G e P. No total foram testadas 38 amostras do Estado de São Paulo e os resultados obtidos foram bastante diversificados, tendo sido encontradas amostras G5, G10,

G11 e G3. Para o genótipo P foram descritos somente P[6] e P[7]. Estas amostras foram ainda caracterizadas para subgrupo, através da utilização de um ELISA com anticorpos monoclonais, onde foram encontrados os subgrupos II e Não-I-Não-II.

Na mesma linha de pesquisa LIMA e colaboradores (1998) utilizaram a técnica de RT-PCR para a caracterização de 6 amostras de suínos positivas para rotavírus provenientes de diferentes granjas do Estado do Paraná. Foram encontrados diversos genótipos G entre as amostras, sendo duas G4, duas G9 e uma G1. Todas as amostras estavam combinadas com o genótipo P[6] (tipo Gottfried). Com exceção de uma amostra que apresentava uma mistura dos genótipos G1+G5 e P[8] (tipo WA).

2.8 VACINAS PARA ROTAVÍRUS SUÍNOS

No contexto do estudo dos rotavírus suínos é importante descrever a existência e a utilização de vacinas, que reduzem o aparecimento de diarreias em leitões, reduzindo a eliminação dos rotavírus para o meio ambiente.

A utilização de vacinas para a prevenção da infecção por rotavírus em animais, principalmente em bovinos e suínos, tem sido baseada em imunização passiva.

Os suínos, ao nascer, são considerados agamaglobulinicos e somente absorvem anticorpos do tipo IgG, nas primeiras 48 horas após o nascimento, através da ingestão de colostro, existindo uma correlação entre os títulos de anticorpos do colostro com os encontrados no soro dos recém-nascidos (SAIF, 1985; SAIF, JACKWOOD, 1990; FU, HAMPSON, WILKS, 1990; SAIF, ROSSEN, PARWANI, 1994). Após este período, a proteção fica restrita apenas à proteção passiva dada pela mucosa intestinal.

A proteção cruzada entre os rotavírus com genótipos G e P diferentes é pequena ou inexistente (BOHL, THEIL, SAIF, 1984), entretanto, em estudos experimentais com suínos gnotobióticos inoculados com amostras de rotavírus que possuem genótipos G e P comuns, tem-se conseguido fazer a indução de uma proteção cruzada parcial (HOSHINO et al, 1988).

Existem pelo menos duas vacinas de rotavírus suíno, licenciadas nos Estados Unidos, para a prevenção de diarreias em leitões desmamados.

A vacina com vírus inativado, administrada por via intramuscular, intraperitoneal ou oral, em animais privados de colostro, conferiu pequena proteção, provavelmente por não induzir a imunidade local ao nível do intestino (WELTER E WELTER, 1990).

A outra vacina, viva atenuada, caracterizada como sorotipo G5P[7] da amostra padrão OSU, de administração oral, protegeu os leitões lactentes e desmamados sob condições experimentais e quando usada em estudos com leitões gnotobióticos (BOHL, THEIL, SAIF, 1984, FITZGERALD, WELTER, WELTER, 1986, WELTER E WELTER, 1990). Entretanto, a eficácia dessa vacina nos testes de campo foi questionada por alguns pesquisadores (HOBLET et al, 1986, WESTERCAMP, 1986).

Segundo SAIF, ROSSEN E PARWANI (1994), as falhas de eficácia dessa vacina foram atribuídas à neutralização do vírus vacinal por anticorpos maternos ou a falhas da vacina na produção de uma resposta imune, que não protegeu contra amostras virulentas após a vacinação.

A imunização passiva das porcas representou uma estratégia alternativa para a prevenção de diarreia em leitões lactentes (SAIF E JACKWOOD, 1990).

A vacinação parenteral de porcas prenhes ou lactentes, com vacina viva atenuada para rotavírus, induziu a um aumento nos anticorpos do tipo IgA e IgG no leite, fornecendo uma proteção parcial contra vírus de campo, a qual foi observada pela redução na duração da diarreia e na eliminação do rotavírus.

SAIF E FERNANDEZ, 1996, verificaram, durante os testes de campo, que a eficácia destas vacinas foi apenas parcial, mas que ocorreu uma diminuição da morbidade e da mortalidade causadas pelos rotavírus.

No Brasil, até o presente momento, não existem vacinas comerciais disponíveis para a prevenção e controle dos rotavírus suínos. Estudos dessa natureza mostram-se como instrumento fundamental nas políticas sanitárias e epidemiológicas, a fim de que se conheçam os subgrupos e sorotipos de rotavírus prevalentes nos plantéis brasileiros.

É importante ressaltar que, à medida que os estudos moleculares avançam, mais tem sido encontradas amostras características de suínos causando infecções em humanos, aumentando a necessidade de outros estudos com amostras animais (NAGESHA E HOLMES, 1988, BELLINZONI et al, 1990, CIARLET E LIPRANDI, 1994, GOUVEA et al, 1994, LEITE et al, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta parte descrevem-se o material e os métodos utilizados na pesquisa realizada no Laboratório de Virologia, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas – ICB da Universidade de São Paulo - USP, de março a outubro de 1998, e que se constitui na parte experimental desta dissertação.

3.1 COLHEITA E MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES

A pesquisa realizada foi de natureza empírica, visto que efetivou-se em uma realidade observável, constituindo-se o material por 167 amostras de fezes de suínos colhidas durante o período compreendido entre junho de 1995 a outubro de 1997, em 52 granjas que apresentavam freqüentes casos de diarreia, de 14 municípios dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos leitões, e armazenadas em frascos plásticos atóxicos com tampa de rosca, apropriados para exame de fezes, em temperatura de -20°C , até o momento do uso, no Laboratório de Virologia do ICB-USP.

Cabe destacar que no Rio Grande do Sul foram colhidas amostras de fezes em 12 propriedades, sendo somente uma amostra de cada granja na fase de creche (de 28 até 60 dias de idade). Em Santa Catarina o total das 38 amostras foram colhidas em 19 granjas, envolvendo as fases de maternidade (do nascimento até 28 dias de idade) e creche. No Estado do Paraná foram selecionadas 21 propriedades nas quais colheram-se 117 amostras de fezes de leitões da maternidade e creche.

3.2 AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS PADRÃO

Foram utilizadas como padrão as amostras de rotavírus gentilmente cedidas pelo Dr. David R. Snodgrass do Moredun Research Institute Eddinburgh, Escócia. Essas amostras foram fornecidas de forma liofilizada, sendo mantidas a 4°C.

3.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE FEZES

Foram preparadas suspensões a 20% (1:5) em tampão Tris/cálcio (Tris/HCl 0,1M; CaCl₂ 1,5 mM; pH 7,3). Após o preparo as amostras foram mantidas durante 30 minutos em temperatura ambiente, sendo submetidas a agitações periódicas em aparelho tipo Vortex para homogeneização. Na seqüência as suspensões foram centrifugadas em centrífuga da marca Eppendorf (modelo 5415-C) a 6000 g durante 15 minutos. Depois de preparadas as suspensões fecais foram guardadas a -20°C até a triagem para identificação de rotavírus.

3.4 TRIAGEM DAS AMOSTRAS FECAIS PARA A PRESENÇA DE ROTAVÍRUS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

As suspensões fecais preparadas foram testadas empregando-se um "kit" comercial de ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus, produzido pela Fundação Oswaldo Cruz Bio-Manguinhos-RJ e denominado comercialmente como EIARA (PEREIRA et al., 1985). Esse ensaio consiste no método "*sandwich*" duplo, em que os antígenos são capturados em fase sólida por soros hiperimunes de cabras e a detecção destes é evidenciada por soros hiperimunes de cobaias. Em seqüência adicionou-se um conjugado marcado com peroxidase. Para a revelação utilizou-se orto-fenilenodiamina (OPD) que, sob ação da peroxidase, dá origem a um

composto de coloração amarela. A leitura da densidade óptica foi feita em espectrofotômetro utilizando-se filtro de 450 nm. Esse teste permite a triagem inicial das amostras do grupo A.

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 orifícios (Nunc-Imuno™ Plate), utilizando-se o protocolo que segue:

3.4.1 SENSIBILIZAÇÃO DAS MICROPLACAS

A sensibilização das microplacas foi feita utilizando-se soros hiperimunes de cabras anti-rotavírus e anti-adenovírus, usados como anticorpo de captura. Os soros de captura foram diluídos em tampão carbonato - bicarbonato (Na_2CO_3 0,016M; NaHCO_3 0,034M pH 9,6), na diluição final de 1:10.000. Depois, 100 μl da diluição do soro anti-rotavírus foi distribuída nas fileiras A,C,E,G da microplaca e 100 μl da diluição do soro anti-adenovírus nas fileiras B, D, F, H. As microplacas foram então incubadas por 2 horas a 37°C, ou por 18 horas a 4°C, em câmara úmida.

3.4.2 LAVAGEM DAS MICROPLACAS

Após o período de incubação o conteúdo da microplaca foi aspirado utilizando-se bomba de aspiração à vácuo e, com micropipetas multicanais, adicionou-se 200 μl de tampão PBS/T (PBS 0,01M pH 7,4; Tween 200.05%). Cada microplaca foi lavada por 3 vezes, aguardando-se 2 minutos entre cada lavagem.

3.4.3 ADIÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES

Cada amostra foi testada em duas diluições, 1:4 e 1:12, para ambos os vírus, rotavírus e adenovírus, de forma que a fileira contendo um dos vírus foi considerada

controle da outra. Como controle positivo de rotavírus (R) foi utilizada a amostra símica SA11, cultivada em células de rim de embrião de macaco Rhesus (MA-104), purificada por ultracentrifugação e diluída em glicerina 50%. Como controle positivo de adenovírus (A) foi utilizada a cepa de adenovírus 2 cultivado em células Hep2.

Depois das microplacas sensibilizadas foram distribuídos 75 µl do diluente de amostra PBS/T/BSA/EDTA (PBS 0,01M pH 7,4; Tween 20 0,05%; BSA 1%; EDTA 0,1M) nas colunas ímpares (1,3,5,7,9 e 11) e 50 µl nas colunas pares (2,4,6,8,10 e 12) da microplacas. A seguir foram acrescentados 25 µl de cada suspensão de fezes que foram testadas em duas diluições (1:4 e 1:12) em dois orifícios da microplaca, contendo cada orifício um dos anticorpos de captura para rotavírus e adenovirus. O controle "R" foi adicionado aos orifícios A11 e B11; o controle "A" é adicionado aos orifícios C11 e D11. Nos orifícios E11, F11, G11 e H11 foram adicionados 25 µl de tampão PBS/T/BSA (PBS 0,01 M pH7,4; Tween 20 0,5%; BSA 1%) que serviram como controle de conjugado (C) e de substrato (S).

As microplacas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, durante 2 horas ou a 4°C, por uma noite.

3.4.4 ADIÇÃO DA MISTURA DE SOROS DETECTORES

Os soros detectores foram produzidos pela inoculação de cobaios com amostras de rotavírus humanos (anti-rotavírus) e com hexon de adenovírus tipo 2 (anti-adenovírus).

Após a incubação as microplacas foram lavadas, conforme descrição anterior, e foram adicionados, em todos os orifícios da microplaca, 100 µl da mistura dos soros detectores (soro hiperimune de cobaio antirotavírus e soro hiperimune de

cobaio antiadenovírus), diluídos a 1:10.000 em PBS/T/BSA. As placas foram novamente incubadas a 37°C, por 2 horas, em câmara úmida.

3.4.5. ADIÇÃO DO SORO CONJUGADO COM PEROXIDASE

O soro conjugado foi preparado em coelhos que foram inoculados com imunoglobulina tipo G (IgG) de cobaio. O soro obtido dos coelhos foi conjugado à enzima peroxidase (Sigma A-7289).

Depois da lavagem das microplacas o conjugado foi diluído à 1:10.000 em tampão PBS/T/BSA e foram acrescentados 100 µl em todos os orifícios da microplaca, com exceção dos orifícios correspondentes ao controle de substrato (S), onde acrescentou-se 100 µl de tampão PBS/T/BSA. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C, por 2 horas, em câmara úmida.

3.4.6 ADIÇÃO DO SUBSTRATO

Após a lavagem adicionou-se 200 µl da solução do substrato (tampão ácido cítrico 0,1M fosfato dissódico 0,2M pH5,6; ortofenilenediamina [OPD] concentração final de 0,4 mg/ml; H₂O₂ [30 volumes] 0,156%, adicionando a H₂O₂ imediatamente antes do uso) em todos os orifícios da microplaca, aguardando-se aproximadamente de 15 a 30 min.

Após o aparecimento de uma tonalidade amarela nítida nos controles de antígeno a reação foi interrompida por adição de 25 µl de ácido sulfúrico 2 M.

3.4.7. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO

A leitura foi feita visualmente, sendo consideradas positivas as amostras que

mostravam cor amarela visível. As placas também foram submetidas à medida da absorbância em espectrofotômetro (Reader Microelisa Sistem, Organon Teknika), utilizando-se filtro de 492 nm, tendo sido consideradas positivas as amostras com densidade ótica maior ou igual ao dobro da média das densidades óticas obtidas no controle de conjugado (C), na presença de apenas um dos soros de captura.

Amostras que reagiram na presença dos dois soros de captura foram reexaminadas para ensaio confirmatório.

3.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A técnica de PAGE foi realizada de acordo com o descrito em PEREIRA et al. (1983), seguindo o seguinte protocolo:

3.5.1. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO VIRAL

A extração do RNA viral foi feita utilizando-se tubos tipo Eppendorf contendo 400 µl da suspensão fecal a 20%, em que foram acrescentados 40 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%, para desproteinização das amostras. Após incubação a 37°C por 30 minutos foram adicionados ao tubo 200µl de fenol e 200 µl de clorofórmio. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente, durante 15 minutos, com agitações periódicas e centrifugados a 13.800 g por 10 minutos em centrífuga Eppendorf (modelo 5415-c). Após a centrifugação os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos previamente marcados, evitando-se colher a interfase. O RNA do vírus foi precipitado por adição, ao sobrenadante, de 40 µl de NaCl 20% e 1,0 ml de etanol gelado. O conteúdo dos tubos foi misturado por agitação e estes foram incubados a -20°C, por uma noite. Após este período foram

centrifugados novamente a 13 800 g por 15 minutos em centrífuga Eppendorf (Modelo 5415-c). Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos com os tubos em posição invertida, à temperatura ambiente. Depois de completamente secos os sedimentos foram ressuspensos em 20 µl de solução dissociadora (Tris/HCl 0,0625M pH 6.8: uréia 5M: SDS 3%: 2-Mercaptoetanol 5%: azul de bromofenol 0.01 %).

Nesse momento a amostra padrão (rotavírus símio SA11. cultivado em células MA-104. ultracentrifugado e diluído em glicerina 50%) também foi diluída, na proporção de 5 µl da amostra para 15 µl de solução dissociadora. Depois, os tubos contendo os sedimentos e a solução dissociadora foram incubados em banho-maria a 56°C, durante 10 a 15 minutos.

3.5.2. PREPARO DAS PLACAS E DO GEL DE POLIACRILAMIDA

As duas placas de vidro, os três espaçadores e o pente foram lavados com água e sabão, secos e limpos com álcool 50%. Foram montados os recipientes de gel, preparados com as duas placas de vidro separadas entre si pelos espaçadores de 1 mm. As extremidades das placas foram seladas com ágar 2%. Nesse momento preparou-se o gel inferior (gel separador) composto de acrilamida 7,5% /bis-acrilamida 0,2%; tampão Tris/HCl 3mM pH8,8; 0,03mM persulfato de amônia e tetrametilenodiamina [TEMED] 0,2 % , que foi imediatamente adicionado à placa até 0,5 cm abaixo da extremidade inferior do pente. Sobre a superfície foi adicionado butanol para nivelar o gel. Após sua polimerização foi adicionado o gel superior (gel concentrador) preparado com acrilamida 3,5% / bisacrilamida 0,2 %; tampão Tris/HCl 6mM pH 6,8; persulfato de amônia 0.015mM e TEMED 0,2 %, que foi

adicionado sobre o gel inferior já polimerizado, colocando-se o pente para a formação de canaletas, para a colocação das amostras, preparadas como descrito no item anterior. Após a completa polimerização do gel as placas foram cuidadosamente fixadas à cuba de eletroforese, de forma que o nível mínimo da placa (onde está o pente) ficou situado a aproximadamente 2 a 3 cm do nível do reservatório superior da cuba. Foram vedados os contatos da placa com o reservatório superior da cuba com ágar 2% e o tampão de corrida (Tris 0,01M, glicina 0,083 M, pH 8,3) foi adicionado aos reservatórios superior e inferior da cuba de corrida. Na seqüência retiramos o pente e colocamos 20 µl de cada amostra a ser analisada, em uma canaleta do gel. A amostra padrão sempre foi colocada na canaleta da extrema esquerda do gel, para delimitar a posição das amostras. Depois de todas as amostras colocadas, a fonte de eletroforese foi ligada, ajustando-se a corrente elétrica em 20mA por placa. Após a saída do corante azul de bromofenol do gel a fonte foi mantida ligada por mais 30 minutos para finalizar a corrida de eletroforese.

3.5.3. COLORAÇÃO DO GEL COM NITRATO DE PRATA

A coloração foi executada de acordo com HERRING et al. (1982) seguindo as seguintes etapas: as placas com o gel foram retiradas da cuba de eletroforese, abertas e retirados os espaçadores, restando somente o gel. O gel foi transferido para uma solução de etanol a 10% e ácido acético 0,5%; após 30 minutos retirou-se a solução fixadora, sendo acrescentada a solução corante (nitrato de prata 0,011 M). Após mais 30 minutos com agitações periódicas o corante foi desprezado e o gel foi lavado rapidamente por 2 vezes com água destilada e, em seguida,

acrescentou-se a solução reveladora de hidróxido de sódio (NaOH) 0,75 M e formaldeído 0,95%. Após a visualização das bandas a revelação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido acético 5%, por 15 minutos. Depois deste tempo o gel foi mantido em uma solução de etanol a 10%, que funciona como conservante do gel até o momento de fotografar e/ou secar.

3.5.4. SECAGEM DO GEL

Para a secagem do gel, inicialmente desprezou-se a solução de etanol a 10% na qual o mesmo estava sendo conservado e adicionou-se a solução de secagem (metanol 65%, etanol 10%, glicerol 0,5%). Duas folhas de celofane foram embebidas nesta solução. Uma das folhas foi usada para recobrir uma placa de vidro. Em seguida o gel foi colocado sobre esta placa e sobre o gel, tendo sido colocada a segunda folha de celofane, de forma que esta envolvesse toda a placa de vidro. As folhas de celofane foram bem esticadas e presas sobre a placa de vidro. Após 2 dias à temperatura ambiente, com o gel totalmente seco, este foi retirado da placa de vidro e guardado para posterior análise.

3.5.5. FOTOGRAFIA DO GEL

Para fotografar os géis, antes da secagem, utilizou-se um equipamento fotográfico denominado Eagle Eye (Eagle Eye™ II – marca Stratagene), acoplado a um microcomputador e impressora, o que possibilitou a impressão das fotografias de todos os géis.

3.6. ULTRACENTRIFUGAÇÃO DE AMOSTRAS ORIGINAIS

O protocolo utilizado para a ultracentrifugação das amostras foi adaptado a partir da descrição feita por MUNFORD, 1995.

Foram selecionadas 59 amostras, testadas inicialmente pelo ensaio imunoenzimático - ELISA e por eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção de rotavírus, para concentração viral por ultracentrifugação.

As suspensões destas amostras foram preparadas no volume de 3,0 ml, conforme descrito no item 3.1. e ultracentrifugadas a 100.000 g por 3 horas a 4°C (Ultracentrifuga Beckman, modelo Optima™ TLX, rotor TLA 100.4). Após este período, os sobrenadantes foram descartados e o sedimento foi ressuspenso em 1,2 ml de tampão Tris/cálcio (Tris/HCl 0,1M; CaCl₂ 1,5mM; pH 7,3).

Depois de preparadas as suspensões fecais ultracentrifugadas foram estocadas a -20°C, até o momento de serem testadas por eletroforese do RNA de rotavírus em gel de poliacrilamida.

3.7. CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DOS ROTAVÍRUS DE ACORDO COM O SUBGRUPO ATRAVÉS DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO UTILIZANDO ANTICORPOS MONOCLONAIS (mAb-ELISA).

A caracterização de subgrupo foi realizada pelo ensaio imunoenzimático do tipo "duplo sanduíche", como descrito por RÁCZ et al. (1993). Foram utilizados anticorpos monoclonais gentilmente cedidos pelo Dr. T. H. Flewett (East Birmingham Hospital, Birmingham, UK) contra rotavírus do grupo A e contra os subgrupos I (255/60) e II (631/9) produzidos pelo Dr. H. B. Greenberg (University of Stanford, Califórnia, EUA). Foram utilizadas como controle dos anticorpos monoclonais a

amostra padrão SA11 específica de grupo A e subgrupo I, e uma amostra humana previamente testada que reagiu com subgrupo II. O teste foi realizado em microplacas de 96 orifícios (Nunc-Immuno™ Plate), de acordo com o protocolo:

3.7.1. SENSIBILIZAÇÃO DAS MICROPLACAS

Os anticorpos monoclonais (mAb) foram diluídos a partir da solução estoque a 1:100 em PBS (0,01 M pH 7,4) e glicerina (v/v), em tampão carbonato-bicarbonato (0,25M pH 9,6) nas concentrações finais de 1:10.000 para o MAb de grupo A e subgrupo II e de 1:5.000 para o mAb de subgrupo I.

Foram distribuídos 100 µl das diluições de cada monoclonal nos orifícios correspondentes da microplaca, em colunas alternadas: o MAb de subgrupo I nas colunas 1, 4, 7, 10, o de subgrupo II nas colunas 2, 5, 8, 11 e o de grupo A nas colunas 3, 6, 9, 12. Em seguida as microplacas foram incubadas por 2 horas a 37°C ou por 18 horas a 4°C, em câmara úmida.

3.7.2. LAVAGEM DAS MICROPLACAS

Após o período de incubação o conteúdo da microplaca foi aspirado, utilizando-se bomba de aspiração à vácuo e, com micropipetas multicanais, adicionou-se 200 µl de tampão PBS/T (PBS 0,01M pH 7,4; Tween 20 0,05%). Cada microplaca foi lavada por 5 vezes, aguardando-se 2 minutos entre cada lavagem.

3.7.3. BLOQUEIO

Após a sensibilização foi feito o bloqueio da reação por adição 200 µl de PBS/T/BSA (PBS 0,01M, pH 7,4; Tween 20 0,05%; BSA 1%) em todos os orifícios

das microplacas e incubando-se por 4 a 6 horas a 4°C.

3.7.4. ADIÇÃO DAS SUSPENSÕES DE FEZES

Após a incubação as microplacas foram lavadas e, em seguida, distribuiu-se o diluente PBS/T/BSA/EDTA (PBS 0,01M, pH 7,4; Tween 20 0,05%; BSA 1%; EDTA 0,1M) em volume de 75 µl em toda placa. Na seqüência adicionou-se 25 µl das amostras aos orifícios correspondentes. Também foram adicionados os controles positivos de rotavírus. Nas depressões correspondentes aos controles de conjugado e substrato adicionou-se 75 µl de PBS/T/BSA. As microplacas foram incubadas, em câmara úmida a 4°C, por uma noite.

3.7.5. ADIÇÃO DO SORO DETECTOR, ADIÇÃO DO SORO CONJUGADO E ADIÇÃO DO SUBSTRATO

A adição dos soros detectores, do conjugado e do substrato foram realizados conforme descrito anteriormente no teste ELISA para a identificação dos rotavírus, mudando-se apenas o número de lavagens das microplacas entre cada etapa de 3 para 5 vezes.

3.7.6. LEITURA E INTERPRETAÇÃO DA REAÇÃO

A leitura foi feita visualmente, sendo consideradas positivas as amostras que mostravam cor amarela visível. As placas também foram submetidas à medida da absorbância em espectrofotômetro (Reader Microelisa System, Organon Teknika), utilizando-se filtro de 492 nm, sendo consideradas positivas para um determinado subgrupo as amostras que apresentavam absorbância duas vezes maior que a

média dos resultados obtidos nos orifícios correspondentes ao controle de conjugado e, pelo menos, duas vezes maior que a D.O. encontrada para o outro subgrupo testado.

3.8. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS G E P PELA TÉCNICA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).

Para a genotipagem das amostras positivas de rotavírus, pela técnica de RT-PCR, foram adotados os protocolos descritos por GOUVEA et al. (1993) e GOUVEA et al. (1994a; 1994b), com algumas modificações na extração do ácido nucleico viral. Em todas as reações foram incluídas, além das amostras a serem testadas, amostras padrões de cada um dos genótipos que funcionaram como controles positivos e água como controle negativo. As amostras-padrão de rotavírus suíno utilizadas foram OSU (G5P[7]) e YM (G11P[7]); de rotavírus bovino NCDV (G6P[1]), UK (G6P[5]) e B223 (G10P[11]); rotavírus humanos WA (G1P[8]) e ST3 (G4P[6]). Nas Tabelas 1 e 2 foram descritas as seqüências de nucleotídeos dos iniciadores (*primers*) sintetizados pelo Laboratório Gibco BRL Brasil e os utilizados para as reações de RT-PCR nesse estudo.

3.8.1 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEÍCO VIRAL

Inicialmente procedeu-se a extração do RNA das suspensões de fezes das amostras de rotavírus, utilizando-se Trizol® Reagent (Gibco BRL 15596), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante:

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA O *SEMI-NESTED* RT-PCR PARA GENOTIPAGEM G DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS IDENTIFICADOS

Iniciador <i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Posição	Genótipo	Tamanho do segmento
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG	1-28		-
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062-1036		-
End(UK)	GGTCACATCATACAACCTCTAATCT	1-24		-
End(CRW8)	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	1-24		-
sBeg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC	1-21		1062 pb
DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	499-481	G[6]	500 pb
ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	714-697	G[10]	718 pb
FT5	CATGACTCGTTGTTACGTC	779-760	G[5]	780 pb
BT11	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	336-316	G[11]	337 pb
HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	273-256	G[8]	274 pb
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	314-335	G[1]	749 pb
aCT2	CAATGATATTTAACACATTTTCTGTG	411-435	G[2]	652 pb
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	689-709	G[3]	374 pb
aDT4	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG	480-498	G[4]	583 pb
aFT9	CTAGATGTAAC TACA ACTAC	757-776	G[9]	306 pb

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS PARA O *SEMI-NESTED* RT-PCR PARA GENOTIPAGEM P DE ROTAVÍRUS DE SUÍNOS IDENTIFICADOS

Iniciador <i>Primer</i>	Seqüência de nucleotídeos (5' – 3')	Posição	Genótipo	Tamanho do segmento
con3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	11-32		-
con2	ATTTCGGACCATTTATAACG	868-887		876 pb
pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	269-289	P[1]	622 pb
pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	336-354	P[5]	555 pb
pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	574-594	P[11]	314 pb
pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	389-412	P[7]	502 pb
pGOTT	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	465-487	P[6]	423 pb
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGT	339-356	P[8]	345 pb
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	474-494	P[4]	483 pb
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	259-278	P[6]	267 pb
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	385-402	P[9]	391 pb
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	575-594	P[10]	583 pb

Em tubos tipo Eppendorf misturou-se um volume de 300 µl da suspensão fecal e 900 µl de Trizol. A mistura foi agitada em agitador tipo Vortex de forma vigorosa e incubada em temperatura ambiente durante 5 minutos. Na seqüência foram adicionados 240 µl de clorofórmio, seguido de agitação no Vortex durante 15 segundos e incubado em temperatura ambiente por 10 minutos.

Depois de incubadas as amostras foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf (modelo 5415-c) a 12.000 g durante 5 minutos. Após a centrifugação transferiu-se a fase superior aquosa para outro tubo previamente marcado. O RNA viral foi precipitado por adição de 1.200 µl de álcool isopropílico e incubado durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas em centrífuga Eppendorf (modelo 5415-c), a 12.000 g por 5 minutos. O sedimento resultante da centrifugação foi lavado por agitação em aparelho tipo Vortex com 1.200 µl de etanol 75% gelado e centrifugado a 7.500 g por 5 minutos. Novamente, foi eliminado o sobrenadante, vertendo-se rapidamente o conteúdo do tubo. A secagem do sedimento foi feita com o tubo em posição invertida no fluxo de ar da capela de fluxo laminar, evitando-se a secagem em demasia.

Depois de seco o sedimento foi ressuspendido com 75 µl de dietilpirocarbonato (DEPC) 1% diluído em água Milli-Q estéril, seguido de incubação por 10 minutos em banho-maria a 55-56°C e guardado a -20°C.

3.8.2. DESNATURAÇÃO DO ÁCIDO NUCLÉICO

Em tubos tipo Eppendorf de 500 µl foram distribuídos 5 µl de cada amostra contendo o dsRNA suspenso em água Milli-Q e adicionados 3 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), seguidos de aquecimento a 97°C, por 5 minutos, para desnaturar a dupla

fita de RNA. Imediatamente após as amostras foram transferidas para um recipiente contendo gelo e água (banho de gelo), onde permaneceram durante 5 minutos, no mínimo. Depois dessa etapa acrescentou-se a mistura de reagentes de PCR (*master mix*).

3.9 TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Para a técnica de RT-PCR, adotou-se os seguintes procedimentos conforme protocolos.

3.9.1 TRANSCRIÇÃO PARA cDNA E PRIMEIRA AMPLIFICAÇÃO

Foi preparada a mistura de reagentes (*master mix*), composta de Tris 10mM pH 8,3; KCl 40 mM; MgCl₂ 1,5mM; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP); 1 uM da mistura dos iniciadores (*primers*) a serem utilizados (Beg9, End9, End UK e End CRW8 para tipagem G e con3, con2 para tipagem P animal e humano). Depois de homogeneizado o master mix foram adicionadas 4 unidades da enzima MuLV-Reverse Transcriptase (Perkin Elmer N808-0018) e 2,5 unidades da enzima AmpliTaq®DNA (Perkin Elmer N801-0161). A seguir foram adicionados 92 µl do *master mix* em cada tubo contendo as amostras. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e centrifugado rapidamente. Depois foram adicionadas duas gotas (50 ul) de óleo mineral, em cada tubo de amostra.

Finalizada a adição de reagentes os tubos foram levados ao termociclador (DNA Thermal Cycler. Perkin Elmer Cetus) com temperatura inicial de 42°C durante 30 min., seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min.; 42°C por 2 min. e 72°C por 1 min..

Quando os 30 ciclos foram finalizados o termociclador atingiu a temperatura de 72°C durante 7 minutos, quando ocorreu a completa extensão das cópias de DNA amplificadas.

3.9.2 SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO (*semi-nested* PCR)

Outro *master mix* foi preparado utilizando-se Tris 10mM pH 8,3; KCl 40 mM; MgCl₂ 1,5mM; 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) e 1 µM da mistura de *primers* a serem utilizados. Para a segunda amplificação de genótipo G e genótipo P animais utilizou-se uma mistura de *primers* suínos e bovinos que foram: sBeg9, DT6, ET10, FT5, BT11 e HT8 para tipagem G e, con2, pNCDV, pUK, pB223, pOSU e pGOTT para tipagem P. Em seguida, 2,5 unidades da enzima AmpliTaq® DNA (Perkin Elmer N801-0161) foram adicionadas e o *master mix* foi adicionado de forma que cada tubo *Eppendorf* continha 99 µl da solução. Depois foram adicionadas 2 gotas de óleo mineral em cada tubo.

Os tubos contendo o *master mix* foram levados para um fluxo laminar localizado em sala separada, onde foi acrescentado 1µl, em cada tubo, do produto da primeira amplificação. Depois foram levados ao termociclador (DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus), onde a mistura foi submetida a 25 ciclos de 94°C por 1 min.; 55°C por 2 min. e 72°C por 1 min.. Após a completa execução dos ciclos o termociclador foi programado para 72°C, durante 7 min. para a completa extensão das cópias amplificadas.

Cabe destacar que algumas amostras foram testadas também com *primers* humanos, que possuem características e denominações diferentes dos *primers* animais, como segue: para a genotipagem G a mistura de *primers* utilizados foi

End9, aBT1, aCT2, aET3, aDT4 e aFT9 e, para genótipo P, foram usados Con3, 1T1, 2T1, 3T1, 4T1 e 5T1 (Tabela 2).

3.9.3 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

As amostras amplificadas foram analisadas em gel de agarose 1,2% diluído em tampão Tris borato/EDTA (TBE, Tris borato 0,045M: EDTA 0,001 M pH8.0) e homogeneizado por aquecimento em forno de microondas. Depois de atingir a forma líquida, a solução de agarose foi colocada em uma placa com pente e aguardou-se a solidificação. Após a solidificação do gel o pente foi retirado e a placa foi colocada na cuba de eletroforese contendo o tampão de corrida (TBE 0,5X), adicionado do corante (brometo de etídeo na concentração final de 0,3 ug/ml). Um volume de 10 µl da amostra resultante da segunda amplificação foi misturado com 2 µl de uma solução corante, constituída por azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0.25%, glicerol 30% e água destilada. A seguir foram aplicados 10 µl de cada amostra em cada canaleta que foi formada pelo pente no gel de agarose. O padrão de peso molecular (100pb DNA Ladder, Gibco BRL 15628-050) foi colocado na primeira e/ou última canaleta.

A fonte de eletroforese foi ligada na cuba de eletroforese e ajustada para a voltagem de 40, 60 ou 80 V (de acordo com o tamanho da placa). A corrida foi monitorada, levando-se o gel para visualização em transiluminador de luz ultravioleta até a migração adequada do padrão de peso molecular.

Após o final da corrida o gel foi fotografado, utilizando-se o equipamento Eagle Eye (Eagle Eye™ II - Stratagene) e salvando-se a imagem em disquete para impressão em impressora de microcomputador.

3.9.4 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Cada amostra padrão foi representada pela amplificação de um segmento de DNA de tamanho determinado, conforme descrito nas Tabelas 3 e 4. Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram segmentos de tamanhos correspondentes aos encontrados nas amostras padrão. Amostras que amplificavam segmentos de tamanhos diferentes e com características de dois ou mais genótipos eram testadas novamente em reação contendo um único *primer* para um genótipo específico, para descartar eventuais erros de contaminação e/ou revelar a presença de mais de um genótipo ocorrendo ao mesmo tempo na amostra.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PADRÃO ANIMAIS, DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS G E P, COM OS RESPECTIVOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS POR RT-PCR.

Amostra animal	Genótipo G	Tamanho do segmento (Pb)	Genótipo P	Tamanho do segmento (Pb)
Bo / UK	6	500	5	555
Bo / NCDV	6	500	1	622
Bo / B223	10	718	11	314
Bo / B37	8	274	-	-
Po / OSU	5	780	7	502
Po / YM	11	337	7	502
Po / Gottfried	4	583	6	423

TABELA 4 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS PADRÃO HUMANAS, DE ACORDO COM OS GENÓTIPOS G E P, COM OS RESPECTIVOS SEGMENTOS AMPLIFICADOS POR RT-PCR.

Amostra Humana	Genótipo G	Tamanho do segmento (Pb)	Genótipo P	Tamanho do segmento (Pb)
Wa	1	749	-	-
DS-1	2	652	-	-
P	3	374	-	-
ST3	4	583	6	423
WI 61	9	306	-	-
RV-5	2	652	4	483
1076	2	652	6	267
KU	1	749	8	345
K8	1	749	9	391
69M	8	-	10	583

4 APRESENTAÇÃO E DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS

Nesta parte, são apresentados e descritos os resultados da pesquisa de campo.

4.1 TRIAGEM DAS AMOSTRAS FECAIS PARA A PRESENÇA DE ROTAVÍRUS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

As 167 amostras colhidas foram submetidas, primeiramente, à triagem para pesquisa de rotavírus pelas técnicas de ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus (ELISA) e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Foram obtidas, no ELISA, 59 (35,33%), amostras positivas para rotavírus suíno das 167 (100%) colhidas e nenhuma amostra foi positiva para adenovírus.

Ainda em relação à triagem das amostras, tanto as positivas como as negativas no ELISA, foram submetidas à triagem por eletroforese, pela qual encontrou-se um total de 15 amostras fracamente positivas, no primeiro momento.

As 59 amostras que foram positivas para rotavírus no ELISA foram submetidas também à ultracentrifugação, com o objetivo de promover uma concentração de vírus, e aumentar a visualização do perfil eletroforético. Após a ultracentrifugação, foi possível obter um aumento no número de perfis eletroforéticos de 15 para 27 amostras visualizadas.

O número de amostras colhidas e a porcentagem de positividade para rotavírus do Grupo A no ensaio imunoenzimático (ELISA), em cada um dos Estados, podem ser observados na Figura 3 e nas Tabelas 5,6 e 7. A distribuição das amostras positivas para rotavírus de acordo com a fase de crescimento dos leitões, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, podem ser analisadas na Tabela 8.

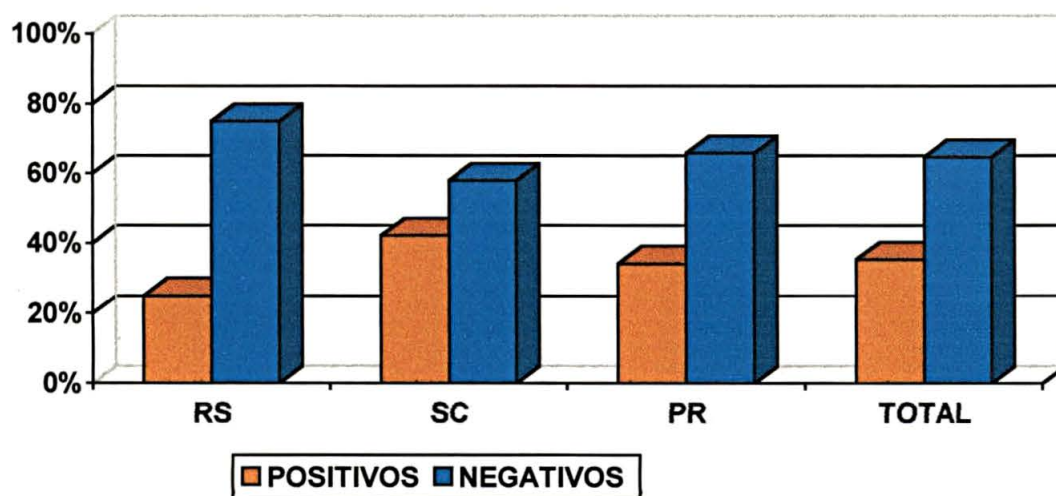


FIGURA 3 – NÚMERO E PORCENTAGEM DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS DO GRUPO A NOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ, POR MEIO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA

TABELA 5 – TOTAL DE AMOSTRAS DE FEZES DE SUÍNOS COLHIDAS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS, PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO, DE ACORDO COM OS MUNICÍPIOS E PROPRIEDADES – PERÍODO DE JUNHO DE 1995 A OUTUBRO DE 1997.

Município	Denominação das Propriedades	Amostras Positivas	Total colhido
Aratiba -RS	6	0	1
	7	1	1
	8	0	1
	9	1	1
Marau - RS	19	0	1
	21	0	1
Guaurama - RS	23	0	1
Lageado - RS	28	1	1
Santa Rosa - RS	31	0	1
	32	0	1
	33	0	1
	35	0	1
Total	12	3	12

TABELA 6 – TOTAL DE AMOSTRAS DE FEZES DE SUÍNOS COLHIDAS NO ESTADO DE SANTA CATARINA E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS, PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO, DE ACORDO COM OS MUNICÍPIOS E PROPRIEDADES – PERÍODO DE JUNHO DE 1995 A OUTUBRO DE 1997.

Município	Denominação das Propriedades	Amostras Positivas	Total colhido
Concórdia - SC	3	0	1
	4	1	1
	5	0	1
	29	0	1
	30	1	1
Xavantina - SC	10	0	1
	11	1	1
	13	1	1
Videira - SC	14	1	1
	15	1	1
	16	0	1
Chapecó - SC	38	0	1
	40	0	1
	41	0	1
	42	0	1
Criciúma - SC	43	2	6
	44	1	6
	45	5	6
	46	2	5
Total	19	16	38

TABELA 7 – TOTAL DE AMOSTRAS DE FEZES DE SUÍNOS COLHIDAS NO ESTADO DO PARANÁ E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS, PELO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO, DE ACORDO COM OS MUNICÍPIOS E PROPRIEDADES – PERÍODO DE JUNHO DE 1995 A OUTUBRO DE 1997.

Município	Denominação das Propriedades	Amostras Positivas	Total colhido
Dois Vizinhos - PR	51	0	6
	52	2	3
	53	1	3
	54	0	2
Marechal Cândido Rondon - PR	55	3	4
	56	1	6
	57	1	3
	58	1	6
	59	4	5
Toledo - PR	47	2	5
	48	0	3
	49	1	6
	50	0	6
Castro - PR	60	3	6
	61	4	6
	62	2	6
	63	3	6
	64	4	6
	65	1	6
	66	2	11
	67	5	12
Total	21	40	117

TABELA 8 – NÚMERO E PORCENTAGEM DE AMOSTRAS FECAIS COLHIDAS E POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS ATRAVÉS DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – ELISA, PROVENIENTES DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ DE ACORDO COM A FASE DE CRESCIMENTO DOS LEITÕES

Estados	Amostras Positivas para Rotavírus					
	Maternidade		Creche		Total	%
	Nº/Total	%	Nº/Total	%		
RS	0/0	-	3/12	25,00	3/12	25,00
SC	5/12	41,66	11/26	42,30	16/38	42,10
PR	27/62	43,54	13/55	23,63	40/117	34,19
Total	32/74	43,24	27/93	29,03	59/167	35,33

Percebe-se pelas Tabelas 5,6,7 e 8 que no Rio Grande do Sul, das 12 amostras de fezes colhidas somente 3 (25,0%) apresentaram-se positivas para rotavírus, enquanto que em Santa Catarina foram identificadas 5 (41,6%) amostras positivas das 12 colhidas na maternidade e 11 (42,3%) na creche foram positivas para rotavírus em um total de 26 amostras. No Paraná a porcentagem de amostras positivas para rotavírus na fase de maternidade foi a mais elevada, com 27 (43,5%) amostras positivas entre 62 amostras colhidas, enquanto que na creche observa-se o menor percentual de positividade para rotavírus, onde, das 55 amostras colhidas, somente 13 (23,6%) foram positivas.

4.2 - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS AMOSTRAS POSITIVAS, POR MEIO DA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Os resultados encontrados no PAGE para os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná foram de 27 (16,2%) amostras positivas entre as 167 (100%) testadas, o que pode ser observado na Tabela 9. Todas as amostras positivas, nesta técnica, demonstraram perfil eletroforético compatível com rotavírus do grupo A, conforme Figura 4.

TABELA 9 - Número e porcentagem de amostras de fezes de suínos testadas para detecção de rotavírus através da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná

Estados	Número de amostras				
	Positivas	%	Negativas	%	Total
RS	2	16,6	10	83,3	12
SC	5	13,1	33	86,8	38
PR	20	17,1	97	82,9	117
Total	27	16,2	140	83,8	167

Entre as 27 (16,2%) amostras de rotavírus identificadas pela PAGE só foi possível identificar os tipos de perfis eletroforéticos em 12 (7,2%) amostras ultracentrifugadas. Todas as amostras demonstraram o mesmo tipo de perfil, não tendo sido observado nenhum perfil eletroforético do dsRNA característico de rotavírus não-A, conforme mostra a Figura 5.

4.3 - CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE SUBGRUPO E SOROTIPO G DAS AMOSTRAS POSITIVAS, POR MEIO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS (mAb-ELISA)

As 59 amostras positivas para rotavírus no ELISA, foram testadas com dois anticorpos monoclonais (mAb) anti-grupo A, denominados nº 1 e nº 2; um anti-subgrupo I e um anti-subgrupo II (anti VP6). Verificou-se que das 59 amostras, apenas 21 (35,59%) reagiram com o mAb anti-grupo A nº 1, 59 (100%) com o mAb anti-grupo A nº 2; 09 (15,25%) amostras foram específicas para subgrupo II e as 50 (84,74%) amostras restantes não demonstraram especificidade para nenhum dos mAb de subgrupo, sendo caracterizadas como nãoI-nãoII, como pode ser observado na Tabela 10.

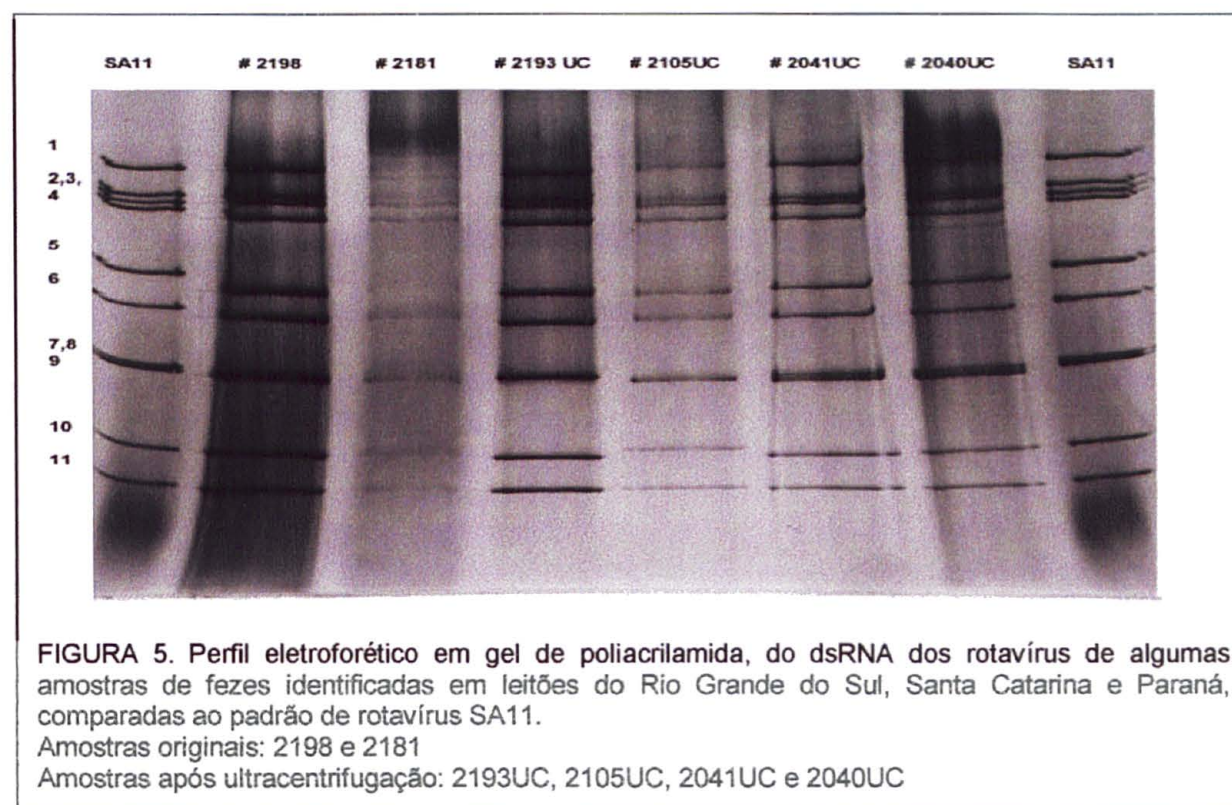
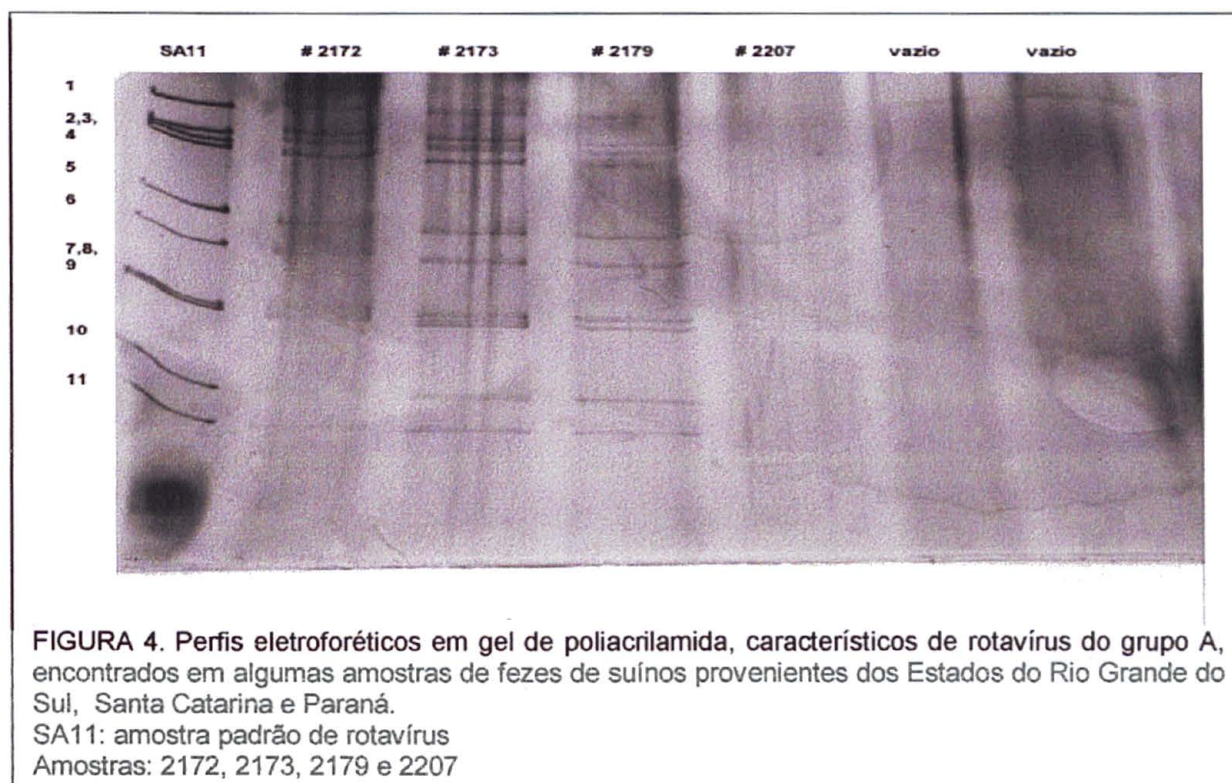


TABELA 10 - RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA QUANTO AO SUBGRUPO DAS AMOSTRAS IDENTIFICADAS COMO ROTAVÍRUS NOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ

Estados	nº de amostras					Total
	MAb Grupo A Nº 1	mAb Grupo A Nº 2	Subgrupo I	Subgrupo II	Subgrupo não I-não II	
RS	2	03			03	03
	6	16			16	16
SC						
PR	13	40		09	31	40
Total	21	59		09	50	59

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE GENÓTIPOS G E P PELA TÉCNICA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA SEGUIDA DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (RT-PCR)

As 59 amostras positivas para rotavírus no ELISA, foram submetidas à reação de RT-PCR, utilizando-se diferentes pares de *primers* para caracterização de genótipo G e genótipo P.

Inicialmente as 59 amostras foram testadas para uma combinação de *primers* para os sorotipos suínos e bovinos (denominados "*primers* animais"), tanto para genótipo G como para genótipo P.

Todas as amostras que apresentavam resultados negativos para o genótipo G com "*primers* animais" foram submetidas a uma nova reação de PCR em que foram utilizados *primers* específicos para os genótipos de rotavírus de humanos G[1], G[2], G[3], G[4] e G[9]. Em relação ao genótipo P, 21 amostras, do total de 59, foram selecionadas e testadas, em uma nova reação, para os "*primers* humanos" P[4], P[6], P[8], P[9] e P[10]. Essas amostras foram selecionadas com base nos resultados obtidos nos testes realizados anteriormente.

Quanto à especificidade para o genótipo G, considerando-se o Estado do Rio Grande do Sul, das 3 amostras positivas para rotavírus testadas por esta técnica, 2 (66,66%) foram caracterizadas como genótipo G[5] e uma amostra não demonstrou especificidade com nenhum dos *primers* animais utilizados. Em Santa Catarina, das 16 amostras analisadas, somente 7 foram específicas para um dos *primers*, sendo que 3 amostras (18,75%) reagiram com o *primer* humano G[3], outras 3 apresentaram especificidade para o genótipo G[5], semelhante à amostra padrão OSU de suíno e uma amostra (6,25%) foi específica para G[10], que é um genótipo freqüentemente encontrado em bovinos e não em suínos. As nove amostras restantes não demonstraram especificidade para nenhum dos *primers* animais ou humanos. No Paraná, assim como ocorreu em Santa Catarina, o maior percentual encontrado foi de amostras negativas para genótipo G, sendo que de um total de 40 amostras testadas, 22 (55%) não reagiram com nenhum dos *primers*. Ainda no Estado do Paraná encontrou-se diversidade de genótipos G, sendo que 2 amostras foram caracterizadas como genótipo G[3], 4 amostras pertenciam ao genótipo G[4], 9 foram específicas para G[5], uma amostra reagiu com o *primer* G[9], outra com o *primer* G[10] e uma amostra mostrou especificidade para dois *primers* ao mesmo tempo, sendo caracterizada como G[4][9]. Nesse caso em que a amostra amplificou segmentos relativos a dois genótipos, efetuou-se uma nova reação de PCR, utilizando-se os dois *primers* separados. Esses resultados podem ser visualizados na Tabela 11 e nas Figuras 6,7,8 e 9.

Com relação à caracterização do genótipo P das amostras do Rio Grande do Sul identificou-se uma amostra específica para P[6], uma amostra com mistura de

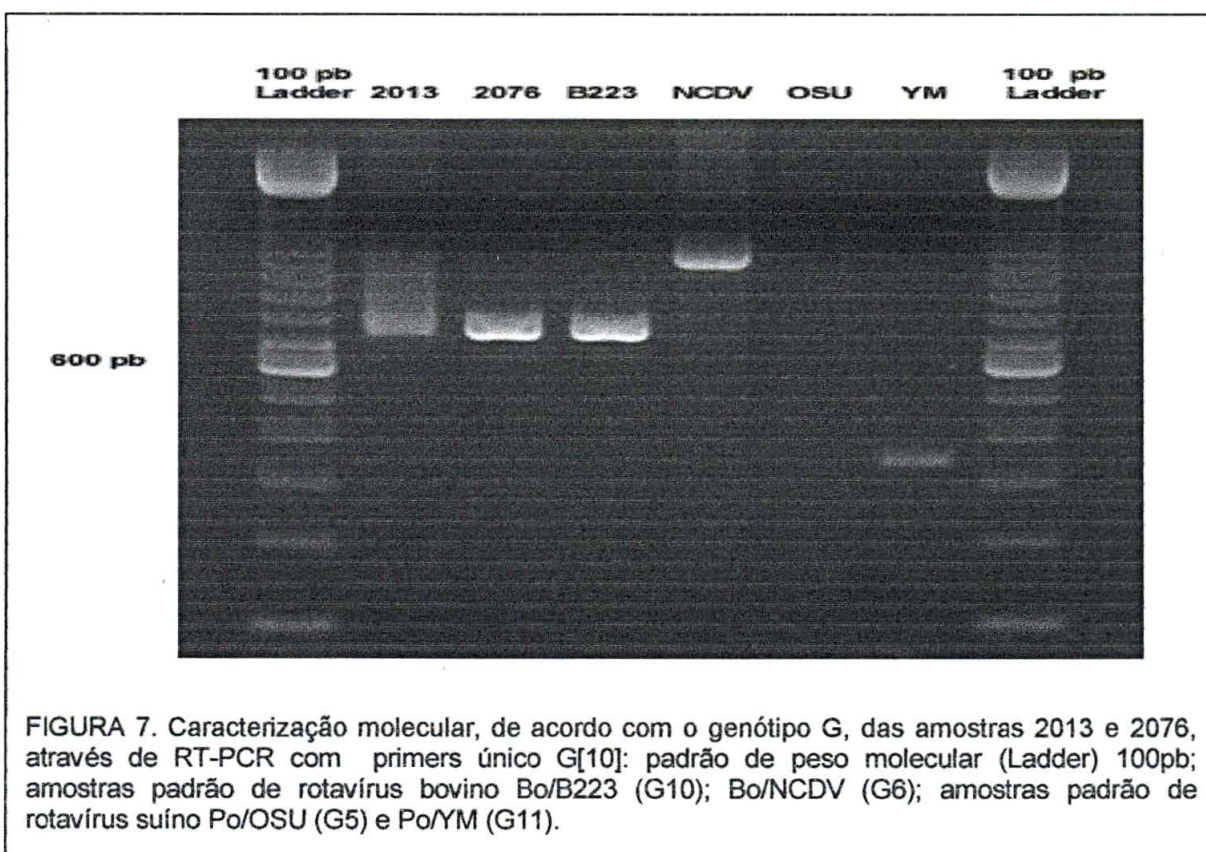
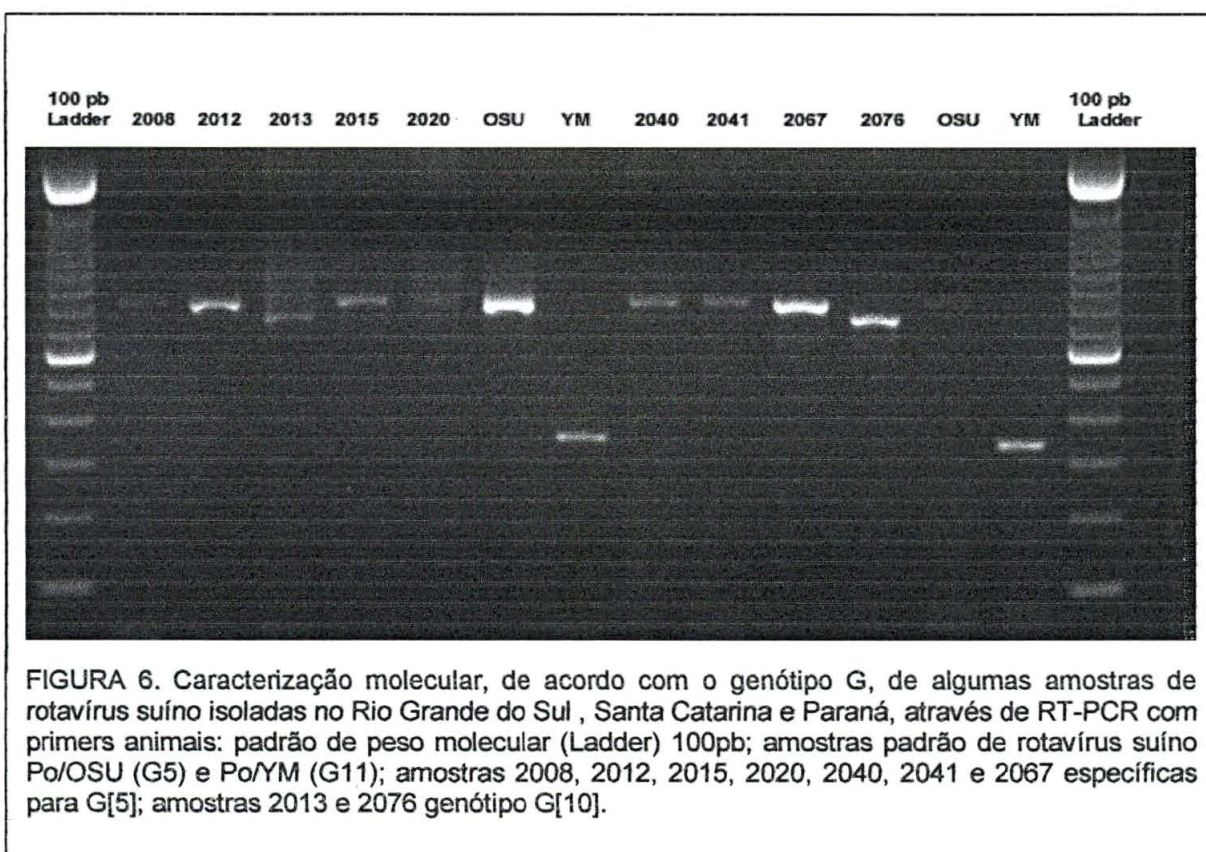
dois genótipos P[6][7] e a outra amostra apresentou-se negativa para genótipo P animal.

TABELA 11. NÚMERO E PORCENTAGEM DE GENÓTIPOS G ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE FEZES DE SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ, PELA TÉCNICA DE RT-PCR

Genótipo G	Estados							
	RS		SC		PR		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
G[3]	0	0	3	18,75	2	5,00	5	8,47
G[4]	0	0	0	0	4	10,00	4	6,78
G[5]	2	66,66	3	18,75	9	22,50	14	23,73
G[9]	0	0	0	0	1	2,50	1	1,69
G[10]	0	0	1	6,25	1	2,50	2	3,39
G[4][9]	0	0	0	0	1	2,50	1	1,69
*G neg	1	33,33	9	56,25	22	55,00	32	54,24
Total	3	100,00	16	100,00	40	100,00	59	100,00

*G neg = Amostra negativa para genótipo G

Das 16 amostras analisadas de Santa Catarina, somente 11 foram caracterizadas para genótipo P. Destas, 3 amostras (18,75%) mostraram especificidade para o *primer* P[6], 2 pertenciam ao genótipo P[7] e 6 amostras apresentaram-se específicas para os dois genótipos P[6] e P[7] ao mesmo tempo. No Estado do Paraná foram identificadas 16 amostras (40%) com especificidade para o genótipo P[6] e 9 amostras reagiram com o *primer* P[7]. Foram caracterizadas 5 amostras como P[6][7], por terem apresentado especificidade para os dois genótipos. Todas as amostras que apresentavam misturas dos genótipo P[6] e P[7] foram analisadas por nova reação de PCR usando-se os *primers* separadamente, segundo a Tabela 12 e as Figuras 10,11 e 12.



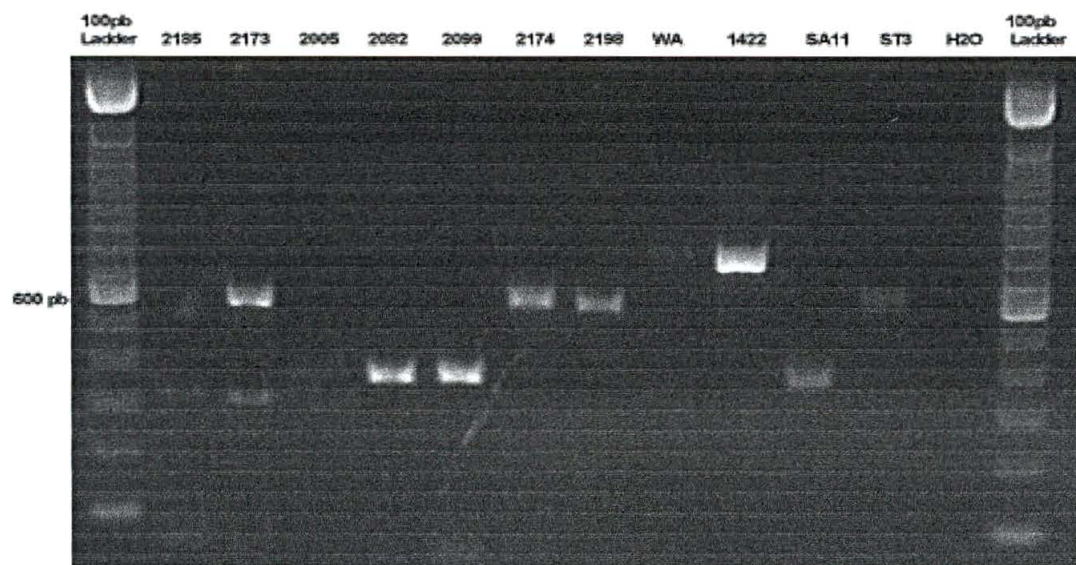


FIGURA 8. Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G, de algumas amostras de rotavírus suíno isoladas no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, por RT-PCR com primers humanos: padrão de peso molecular (Ladder) 100 Pb; Amostra padrão de rotavírus humano WA (G1); 1422 (G2); SA11 (G3); e ST3 (G4): Amostras genotipadas: 2185 caracterizada como G9; 2173 apresentou especificidade para G4 e G9; 2005, 2082 e 2099 específicas para G3; 2174 e 2198 caracterizadas como G4.

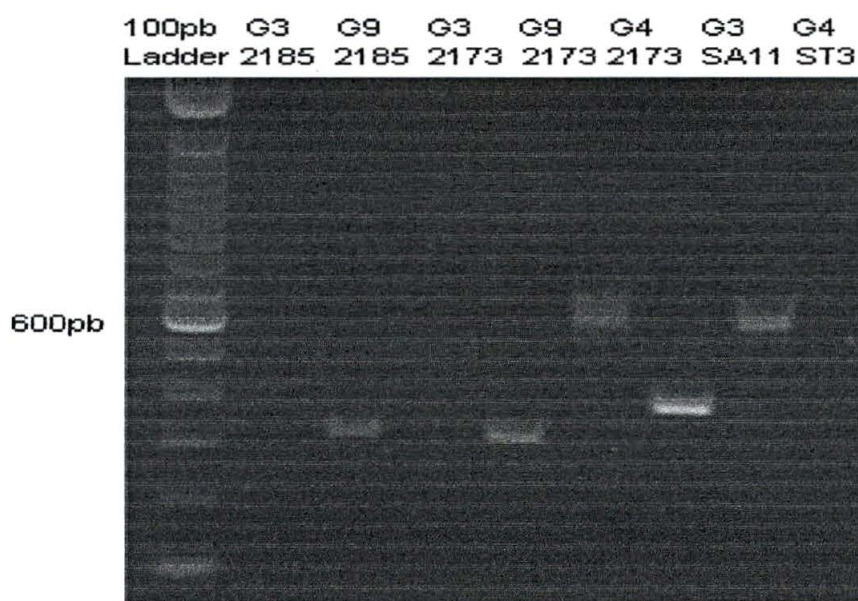


FIGURA 9. Caracterização molecular, de acordo com o genótipo G, das amostras 2185 e 2173, isoladas na região de Castro, Paraná, através de RT-PCR com os *primers* humanos para os genótipos G3, G4 e G9. Padrão de peso molecular (Ladder) 100 Pb; Amostras padrão de rotavírus humano SA11 (G3) e ST3 (G4); Amostras genotipadas 2185 específica

Das 21 amostras avaliadas com a combinação de *primers* humanos, 13 amostras foram caracterizadas como P[6] e 7 amostras apresentaram-se negativas para genótipo P humano.

TABELA 12. NÚMERO E PORCENTAGEM DE GENÓTIPOS P ENCONTRADOS EM AMOSTRAS DE FEZES DE SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ, PELA TÉCNICA DE RT-PCR

Genótipo P	Estados							
	RS		SC		PR		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
P[6]	1	33,33	3	18,75	16	40,00	20	33,90
P[7]	0	0	2	12,50	9	22,50	11	18,64
P[6][7]	1	33,33	6	37,50	5	12,50	12	20,34
*P neg	1	33,33	5	31,25	10	25,00	16	27,12
Total	3	100,00	16	100,00	40	100,00	59	100,00

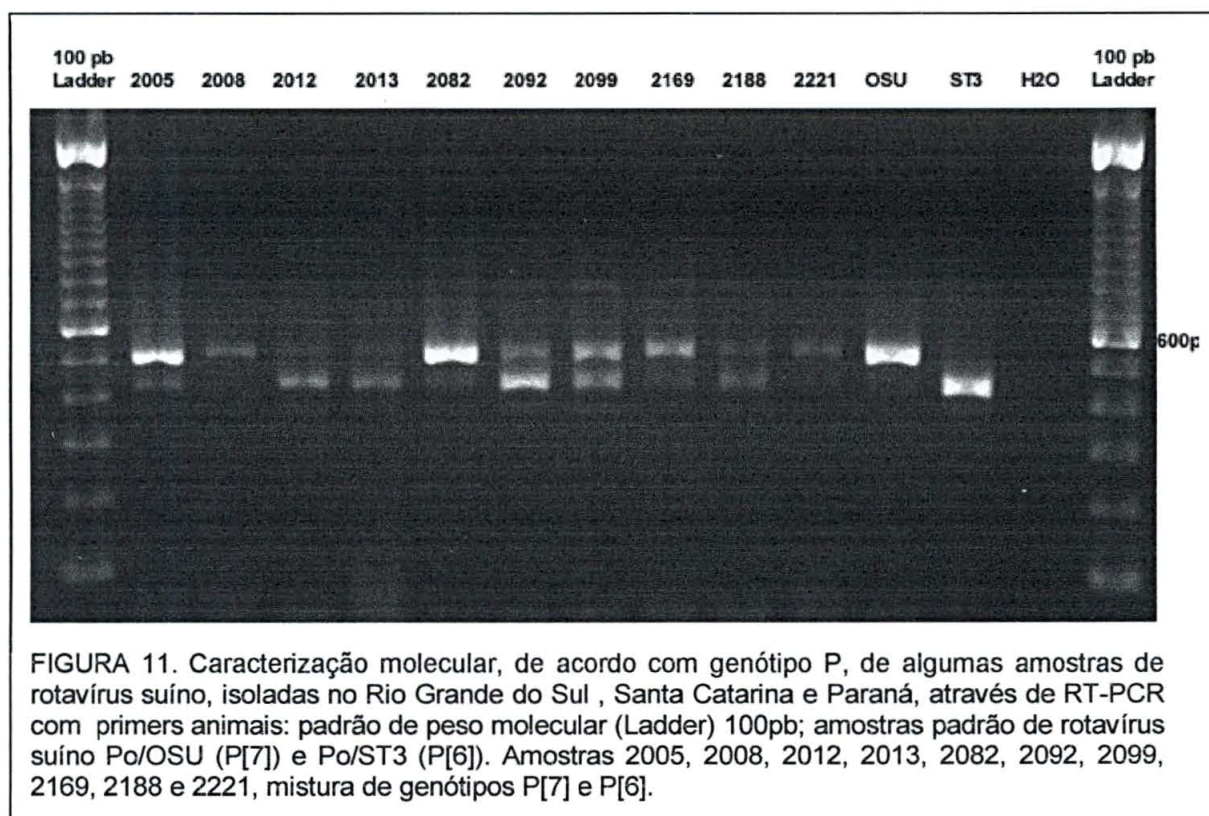
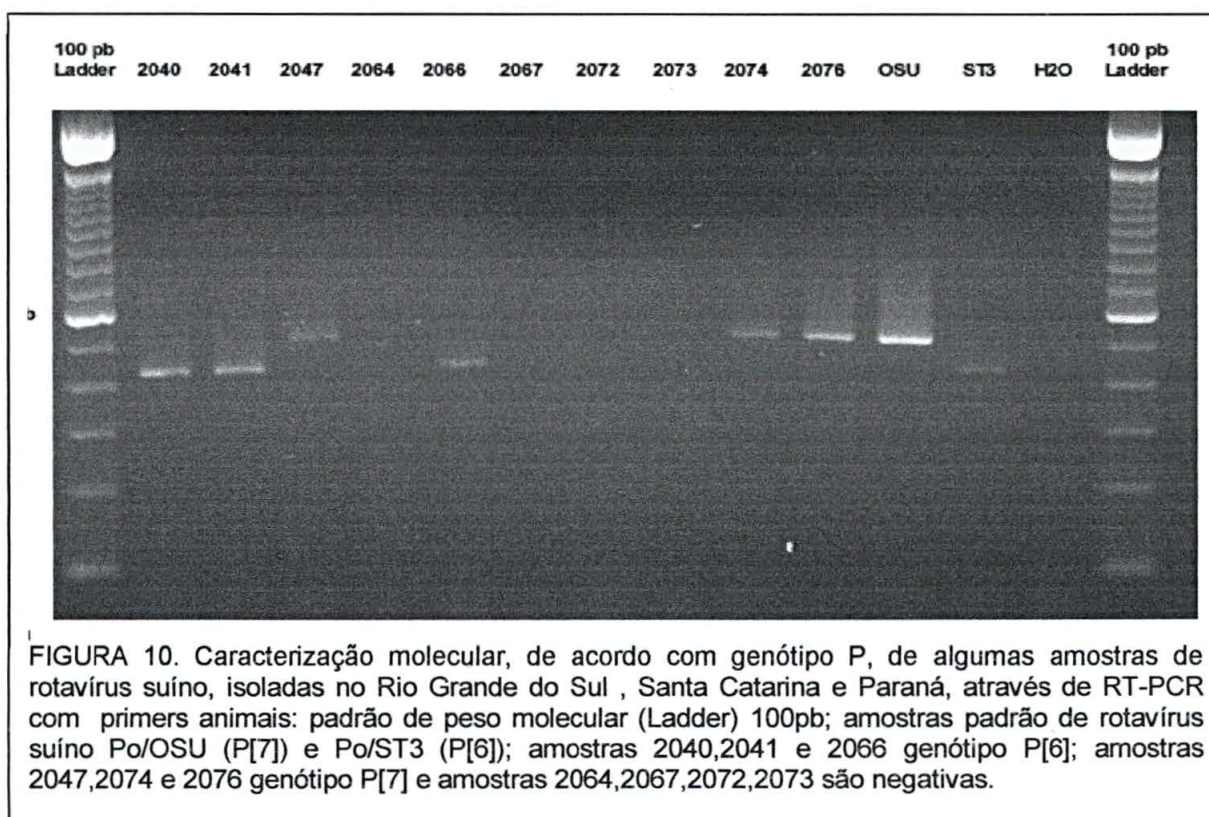
P neg = Amostra negativa para genótipo P

4.5 CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E MOLECULAR DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS

As 59 amostras identificadas como rotavírus foram caracterizadas de acordo com o subgrupo, sorotipo/genótipo G e genótipo P, sendo que os resultados podem ser visualizados na Tabela 13 e nas Figuras 13 e 14.

Com base na análise da Figura 13 percebe-se que a distribuição dos rotavírus nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, de acordo com o genótipo G, é desigual.

A distribuição dos rotavírus caracterizados de acordo com o genótipo P, nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, pode ser visualizada na Figura 14, onde percebe-se a ocorrência dos genótipos P[6] e P[7] nos três estados, mas em frequências distintas.



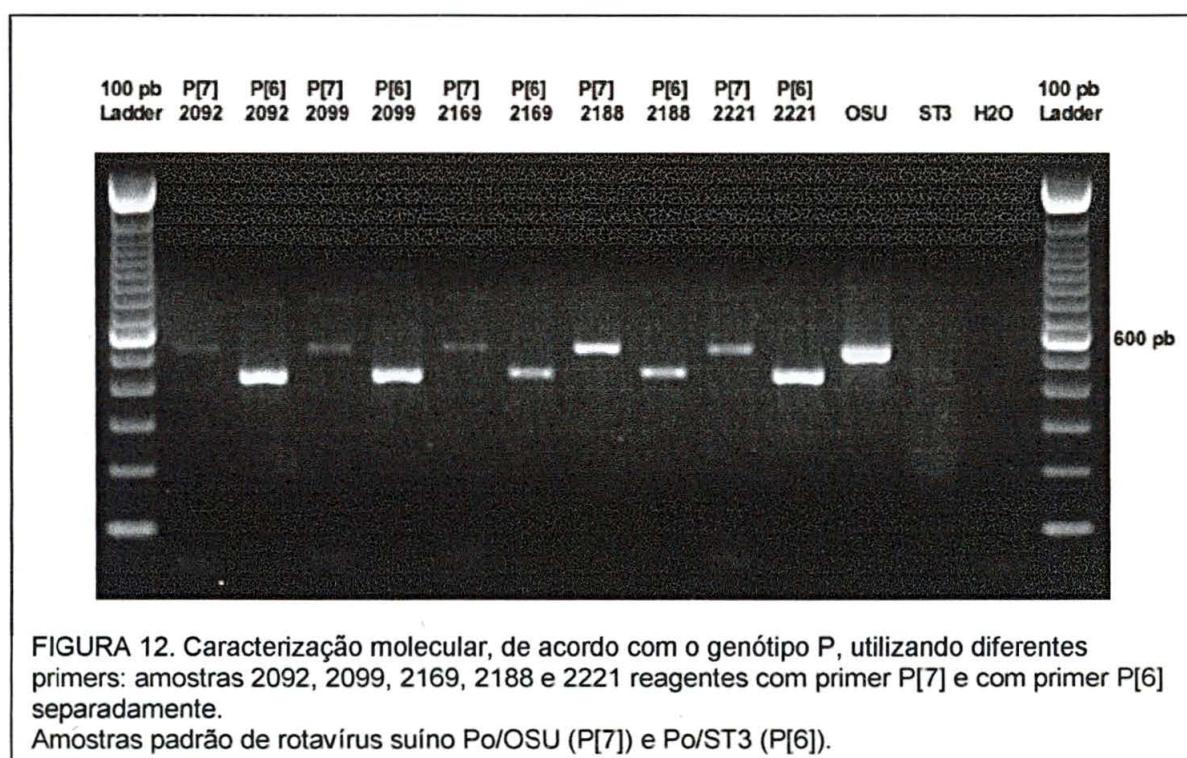


TABELA 13. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA ROTAVÍRUS IDENTIFICADAS NOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ, QUANTO AO SUBGRUPO, GENÓTIPO G E GENÓTIPO P, UTILIZANDO-SE *PRIMERS* ESPECÍFICOS PARA ROTAVÍRUS DE SUÍNOS, BOVINOS E HUMANOS

Genotipo G	Genotipo P								Total
	P[6]		P[7]		P[6][7]		*P neg		
	II	nl-nII	II	nl-nII	II	nl-nII	II	nl-nII	
G[3]	0	1	0	0	0	4	0	0	5
G[4]	2	1	1	0	0	0	0	0	4
G[5]	1	5	0	2	0	3	0	3	14
G[9]	0	1	0	0	0	0	0	0	1
G[10]	0	0	0	1	0	1	0	0	2
G[4][9]	1	0	0	0	0	0	0	0	1
G neg **	1	7	1	6	0	4	2	11	32
Total	5	15	2	9	0	12	2	14	59

*P neg = Amostras não caracterizadas de acordo com o genótipo P

** G neg = Amostras não caracterizadas de acordo com o genótipo G

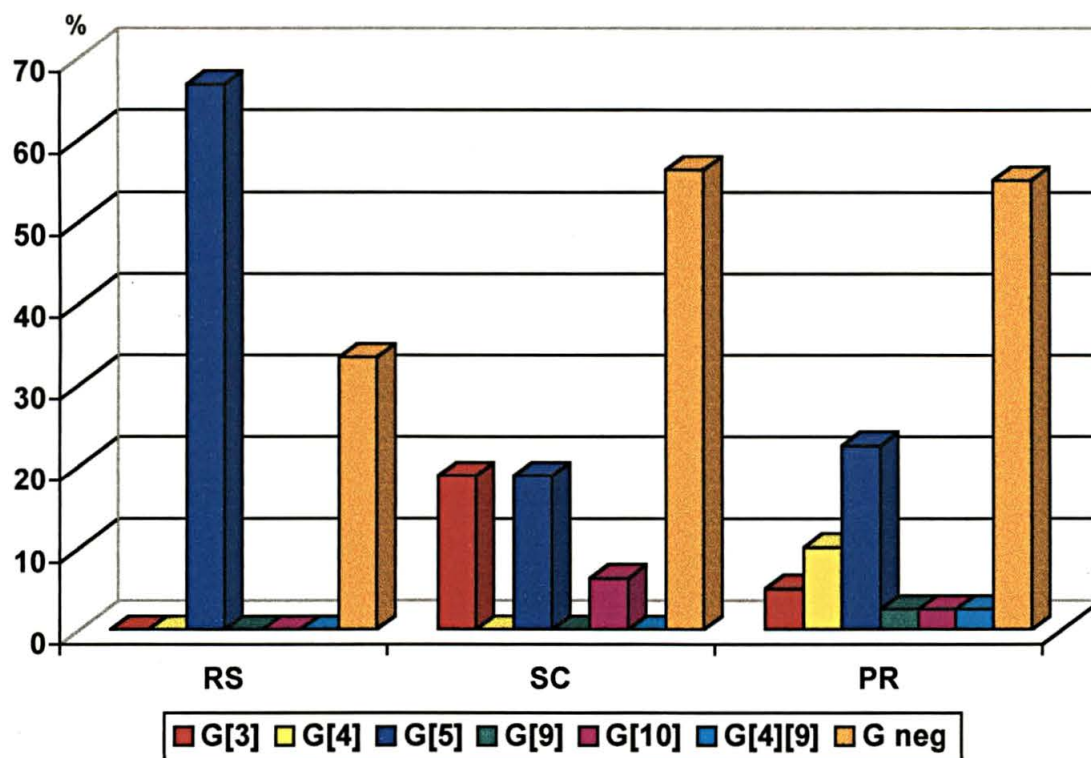


FIGURA 13. PERCENTAGEM DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS CARACTERIZADAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO G, IDENTIFICADAS POR RT-PCR EM FEZES DE SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ.

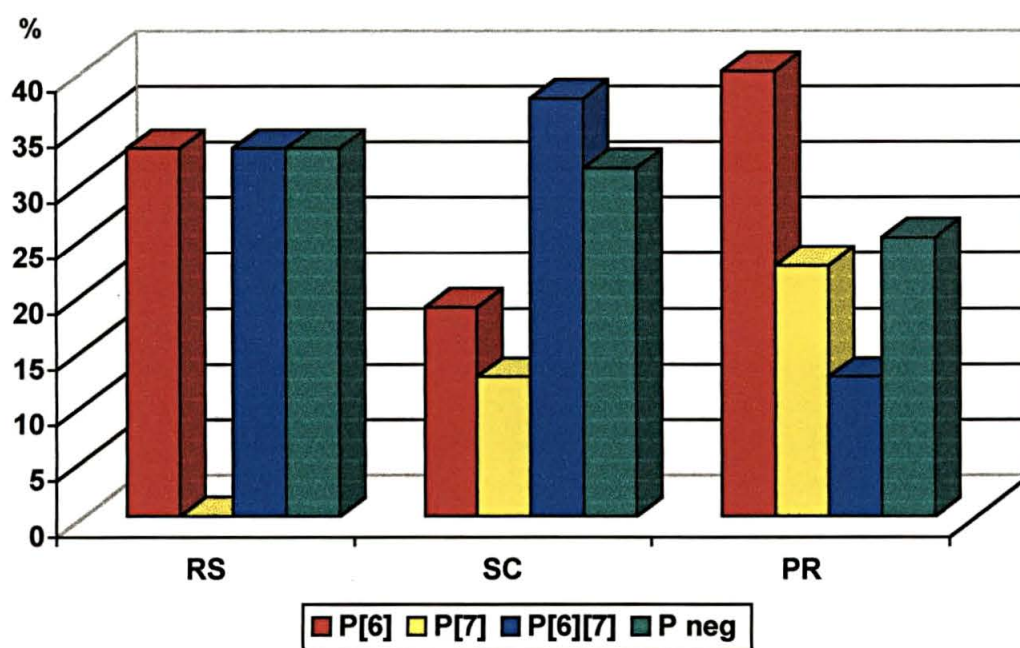


FIGURA 14. PERCENTAGEM DE AMOSTRAS DE ROTAVÍRUS CARACTERIZADAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO P, IDENTIFICADAS POR RT-PCR EM FEZES DE SUÍNOS DOS ESTADOS DO RIO GRANDE DO SUL, SANTA CATARINA E PARANÁ.

5 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A discussão dos resultados está apresentada na mesma seqüência em que foram apresentados e discutidos os resultados da pesquisa de campo.

Os resultados evidenciaram que houve ocorrência de rotavírus em leitões nas fases de maternidade e creche, em granjas que apresentavam casos de gastroenterite aguda, na região Sul do Brasil. O percentual obtido de ocorrência de rotavírus foi de 35,33% entre as 167 amostras fecais analisadas, correspondendo a 59 amostras positivas que foram caracterizadas sorologicamente para grupo através do ensaio imunoenzimático para rotavírus e adenovírus (EIARA) e pelo ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais (mAb-ELISA), sendo pertencentes ao grupo A.

Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa, no que se refere ao percentual de amostras positivas para rotavírus suínos detectados por ELISA, nas fases de maternidade (43,24%) e creche (29,03%), descritos na Tabela 8, constam nos trabalhos, como segue.

SAN JUAN et al. (1986) realizaram estudos em 19 granjas do Estado de São Paulo, detectando entre 302 amostras de fezes de suínos, por ensaio imunoenzimático (ELISA), um percentual de 20,5% de amostras positivas para rotavírus, enquanto que por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) foi de 18,2%.

BITTENCOURT e CANDEIAS (1986), no mesmo ano, também estudando amostras de suínos de São Paulo detectaram rotavírus, por ELISA, em 43,57% em 140 amostras de fezes.

GATTI et al. (1989a) diagnosticaram rotavírus em 90,9% e 84,6% das amostras de fezes de suínos da região de Campinas, SP, utilizando as técnicas de ELISA e PAGE, respectivamente.

JOERGENSSEN, ODIAWO, HALLIWELL (1990) detectaram rotavírus suínos, pelo ELISA, em 217(33%) amostras de um total de 662 analisadas. GEYER et al. (1995) também utilizando a técnica de ELISA, encontraram rotavírus em 24 % das amostras de fezes de suínos analisadas na África do Sul.

Das 167 amostras testadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, 27 foram positivas, mas somente em 12 amostras ultracentrifugadas foi possível identificar, de maneira clara, o tipo de perfil eletroforético do rotavírus.

Os perfis eletroforéticos observados foram característicos dos rotavírus do grupo A que têm sido relatados, na literatura revisada, como os mais freqüentemente identificados nos quadros de diarreias, tanto no homem como em animais em geral (JEREZ et al, 1987, WENTZ et al., 1988, KASSUBA, SAIF, GREENBERG, 1990, WILL et al., 1994, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

A análise dos perfis revelou a presença de um único eletroferótipo, do tipo “longo”, cujos segmentos do grupo IV (10 e 11) migraram mais rapidamente no gel.

Algumas amostras foram ultracentrifugadas com a intenção de aumentar a concentração de vírus, em função do número reduzido de perfis eletroforéticos que estavam sendo visualizados pelo PAGE. Esta técnica provou ser eficiente para a concentração de partículas virais, uma vez que aumentou a nitidez dos 11 segmentos do RNA dos rotavírus, quando nova PAGE foi realizada. Resultados semelhantes foram descritos por MUNFORD, 1995, trabalhando com amostras de

rotavírus bovino e tendo utilizado a técnica de concentração de amostras para melhorar os resultados tanto no ELISA como na PAGE.

A discordância de resultados observada nesse trabalho, entre as técnicas de ELISA e PAGE, que detectou 59 amostras positivas para rotavírus por ELISA e somente 27 por PAGE, pode ser explicada pelo seguinte fato: enquanto o ELISA identifica os antígenos presentes na proteína VP6 do capsídeo interno do vírus, que podem estar presentes tanto na partícula viral íntegra como na partícula incompleta ou degradada do vírus, a PAGE identifica somente a presença de todos os 11 segmentos do dsRNA viral, não sendo possível a visualização de partículas virais incompletas. Outro fator que deve ser considerado foi o congelamento das amostras durante o período compreendido entre o início das coletas e a utilização das mesmas na pesquisa que pode ter afetado a integridade das partículas do rotavírus.

Assim como foi observado no trabalho em discussão, outros autores também relataram discordâncias entre os resultados obtidos por ELISA e PAGE. Em estudos realizados por GATTI et al. (1989a) com amostras suínas, foi possível diagnosticar 84,6% de amostras positivas para rotavírus por PAGE e 90,9% pelo ELISA.

GATTI et al. (1988) compararam as técnicas de imunoeletromicroscopia (IEM), ELISA e PAGE para a detecção de rotavírus em fezes diarreicas de suínos e verificaram que a PAGE foi mais sensível que o ELISA e a IEM.

Nesta mesma época FU (1974) avaliou um *kit* de ELISA comercial para a detecção de rotavírus do grupo A em fezes de suínos, comparando-o a microscopia eletrônica e à PAGE. Esse estudo mostrou que o ELISA apresentava uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97%, enquanto que a PAGE tinha 81% de sensibilidade e 100% de especificidade. O ELISA foi 10 vezes mais sensível

que a microscopia eletrônica e do que a PAGE, resultado semelhante ao obtido neste trabalho em que o PAGE detectou apenas 45% das amostras positivas pelo ELISA.

Recentemente, na Polônia, MARKOWSKA et al. (1996) fizeram a avaliação das técnicas de ELISA, imunofluorescência, microscopia eletrônica e PAGE para a utilização no diagnóstico de rotavírus suíno. O ELISA foi usado para o *screening* de rotavírus, tendo sido eficiente e efetivo para a avaliação da presença dos antígenos virais nas fezes. A PAGE foi utilizada para análise dos diferentes eletroferótipos do dsRNA dos rotavírus. As demais técnicas foram usadas para a confirmação da presença do vírus quando isolamentos em culturas de células foram utilizados.

Já em trabalho de GOUVEIA, NOZAWA e ARAÚJO (1991) também com amostras suínas, a discordância de resultados entre as técnicas de PAGE e ELISA foi praticamente inexistente, sendo que por PAGE foi possível identificar uma amostra positiva a mais que no ELISA, resultados discordantes deste trabalho. Não há possibilidade de explicar esta diferença, visto que o trabalho não apresenta as condições na qual foi realizado.

HUANG et al. (1992) utilizaram as técnicas de ELISA e PAGE para o diagnóstico de rotavírus bovino, constatando uma concordância de 34,5% entre os resultados.

De acordo com a literatura consultada, evidencia-se que o subgrupo I é o mais freqüentemente encontrado em bovinos e suínos, o subgrupo II tem sido relatado como o mais comumente encontrado em humanos, embora também tenha sido descrito ocorrendo em amostras suínas e eqüinas e o subgrupo nãoI-nãoII em aves

e eqüinos (GREENBERG et al., 1983b, HOSHINO et al., 1987, LIPRANDI et al., 1990, COSTA MENDES et al., 1993, HOSHINO e KAPIKIAN, 1994).

Quanto à caracterização sorológica de subgrupo, as 59 amostras de rotavírus suíno identificadas reagiram com o mAb de grupo A nº 2, sendo que dessas, 9 foram específicas para o mAb de subgrupo II e as 50 restantes, não demonstraram especificidade para os subgrupos I ou II, sendo caracterizados como subgrupo nãoI-nãoII (Tabela 10).

MATTION, BELLINZONI, BACKWALL (1989) realizaram uma pesquisa para rotavírus em 156 amostras de leitões, entre 1 e 45 dias de idade, que apresentavam diarreia, em rebanhos de Buenos Aires e Córdoba, na Argentina. Através do PAGE foram detectadas 60 amostras positivas, enquanto que pelo ELISA específico de grupo A, somente 55 amostras foram positivas. A caracterização de subgrupo, por ELISA, com anticorpos monoclonais, mostrou que das 32 amostras positivas, 13 pertenciam ao subgrupo I, 2 ao subgrupo II, 2 eram subgrupo I e II ao mesmo tempo e 15 eram nãoI-nãoII. A caracterização de sorotipo foi feita por testes de neutralização, onde 10 amostras foram classificadas como sorotipo 5 e outras foram designadas como pertencentes a novos sorotipos suínos.

KASSUBA, SAIF, GREENBERG (1990) realizaram estudo com 56 amostras suínas, das quais 41% foram classificadas como subgrupo I, 25% como subgrupo II e 34% como nãoI-nãoII.

Comparando os resultados encontrados pelos autores mencionados acima com os deste estudo, confirma-se a ocorrência dos subgrupos II e nãoI-nãoII em amostras de rotavírus suínos em diferentes países, inclusive no Brasil, embora

neste trabalho a ocorrência de rotavírus do subgrupo nãoI-nãoII (84,7%) tenha sido muito superior à descrita em outros países.

NAGESHA e HOLMES (1991) demonstraram, em suínos da Austrália, a ocorrência de amostras pertencentes tanto ao subgrupo I como ao subgrupo II. Nas amostras estudadas, esses autores constataram a presença dos sorotipos G3 e G5, sempre associados ao subgrupo I, e do sorotipo G4 que possuía especificidade para o subgrupo I em algumas amostras e para o subgrupo II em outras, evidenciando, já naquela época, que a natureza antigênica dos rotavírus é relativamente complexa. Nas amostras de rotavírus suínos identificados na Região Sul do Brasil também foi possível verificar a presença de 3 amostras do sorotipo G4 associadas ao subgrupo II e 1 associada ao subgrupo nãoI-nãoII.

GONZÁLES et al. (1995) descreveram uma amostra de rotavírus suíno isolada na Argentina, denominada CN86, e que estava antigenicamente relacionada com o sorotipo G1 humano. A seqüência de aminoácidos da proteína VP6 foi determinada, mostrando que a amostra possuía características muito semelhantes às amostras WA humana e Gottfried suína, com relação ao subgrupo II. A reatividade dessa amostra com o subgrupo II foi confirmada pelo ELISA com anticorpos monoclonais. Essas características do tipo G1 – subgrupo II, que até o momento tinham sido descritas somente em humanos, dão suporte para a hipótese da existência de uma linhagem homem-suíno para o gene que codifica a VP6.

Convém evidenciar que o sorotipo G1 não foi detectado entre as amostras analisadas nesta pesquisa, mas constatou-se a existência de amostras dos sorotipos G4 e G5 e de uma mistura dos sorotipos G4 e G9, associados ao

subgrupo II, que poderiam confirmar a hipótese de transmissão inter-espécies dos rotavírus.

EL-ASSOULI (1996) investigou as possíveis relações entre subgrupo, sorotipo e eletroferótipo em amostras humanas, na Arábia Saudita. Das 84 amostras examinadas, 12 (14,3%) pertenciam ao subgrupo I, 69 (82,1%) ao subgrupo II e 3 (3,6%) ao subgrupo I e II. Tanto as amostras do subgrupo I como as do subgrupo II mostraram eletroferótipos do tipo longo e curto simultaneamente, e independentemente do eletroferótipo, as amostras foram caracterizadas como pertencentes aos sorotipos G1, G2, G3 e G4, não sendo possível estabelecer uma relação entre estas três variáveis.

Em estudo recente, STEELE e colaboradores (1998) também procuraram estabelecer uma correlação entre os subgrupos e eletroferótipos em amostras de rotavírus humanos, na Zâmbia, mostrando uma estreita relação entre o subgrupo II e eletroferótipo do tipo longo e subgrupo I e eletroferótipo de perfil curto, para todas as amostras.

Para as amostras de suínos analisadas no presente estudo, não foi possível estabelecer uma correlação entre os subgrupos, genótipos e eletroferótipos encontrados. Ao contrário dos resultados observados nos trabalhos de MATTION, BELLINZONI, BLACKWALL (1989), KASSUBA, SAIF GREENBERG (1990), NAGESHA e HOLMES (1991) e PUERTO et al. (1996), essa pesquisa mostrou a ocorrência de um número elevado de amostras caracterizadas como subgrupo nãoI-nãoII (84,75%) e do subgrupo II (15,25%), enquanto que nenhuma amostra foi específica para subgrupo I.

A caracterização molecular das 59 amostras de rotavírus suínos foi realizada pela reação de RT-PCR, utilizando-se diferentes pares de *primers* específicos para os genótipos G e P de rotavírus suínos, bovinos e humanos.

Analisando-se os resultados obtidos por esta técnica, apresentados na Tabela 13 e nas Figuras 13 e 14, percebe-se, nos três Estados estudados, a presença do genótipo G5 em 23,73% das amostras, que foi o mais encontrado nos suínos. Os genótipos G3, G4 e G10 também foram observados, mas em percentuais menores em 8,47%, 6,78% e 3,4% das amostras, respectivamente.

O sorotipo G5, predominante em suínos e encontrado também em eqüinos, foi identificado em amostras de crianças brasileiras com diarréias severas (GOUVEA et al., 1994, TIMENETSKY et al., 1994, GENTSCH et al., 1996, LEITE et al., 1996).

CIARLET, LUDERT, LIPRANDI (1995) mencionaram a ocorrência de amostras de rotavírus suínos caracterizados como genótipo G3 e G5, na Venezuela e Argentina.

O sorotipo G3 tem sido encontrado em várias espécies animais como coelhos, murinos, macacos, cães, eqüinos, bovinos e suínos, ocorrendo também em humanos (BROWNING et al., 1992, KAPIKIAN e CHANOCK, 1996, ADAH et al., 1997).

TIMENETSKY et al. (1997) relataram a existência de um novo sorotipo de rotavírus humano, isolado de uma amostra brasileira, que possuía especificidade para os sorotipos G5 e G11, ao mesmo tempo.

De acordo com BEARDS et al. (1992), URASAWA et al. (1992) e GERNA et al. (1992) os sorotipos G6 e G10, que eram identificados somente em bovinos, foram também descritos em crianças e recém nascidos, e mais recentemente

PONGSUWANNA et al.(1996) realizaram a caracterização sorológica e genômica de rotavírus suíno da Tailândia encontrando 3 amostras específicas para o sorotipo G3 e 14 para o sorotipo G10. Uma amostra do sorotipo G10 (cepa P343) foi isolada em cultura de células Ma-104 e a seqüência de nucleotídeos dos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4 foram determinados. Através da análise da seqüência e dos testes de neutralização cruzada, foi possível estabelecer que a amostra P343 possuía características tipo “B223-like” e “UK-like”, ou seja, G10P[7]. Estas características não tinham sido detectadas em amostras de suínos, sugerindo a existência de transmissão de rotavírus inter-espécies entre bovinos e suínos.

Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo, que detectou a ocorrência de uma amostra com características G10P[7] e outra G10P[6][7], ambas associadas ao subgrupo nãoI-nãoII.

No Estado do Paraná encontrou-se a maior variedade de genótipos G, incluindo o genótipo G[9] que até o presente não havia sido descrito em suínos, mas tão somente em humanos. Ainda no Paraná foi possível identificar uma outra amostra que apresentava especificidade para os genótipos G[9] e G[4], ao mesmo tempo. As duas amostras identificadas como G[9] estavam associadas ao genótipo P[6] e, apesar de pertencerem a região de Castro, foram colhidas de granjas diferentes (granja 61 e 63). As coletas de amostras, nas duas propriedades em questão, foram realizadas no mesmo período, durante os meses de junho e julho de 1996, na maternidade e creche. As duas amostras G[9] foram obtidas de animais com idade entre 1 e 28 dias e que apresentavam diarreia.

Relatos da existência do genótipo G9 foram feitos por DAS et al. (1994), RAMACHANDRAN et al. (1996) e GENTSCH et al. (1996) estudando amostras de

fezes de crianças da Índia, onde revelaram uma alta percentagem do genótipo G9P[6].

Na análise dos resultados da presente pesquisa foram encontrados os genótipos P[6] e P[7] nos três Estados da Região Sul, ocorrendo de forma isolada ou misturados na mesma amostra. Em Santa Catarina observou-se o predomínio de amostras contendo mistura dos dois genótipos, que ocorreu em 37,5% das amostras seguidas por 18,75% de P[6] e por 12,5% de P[7], independentemente da região e do período de coleta das amostras. No Estado do Paraná o genótipo P[6] foi encontrado em 40% das amostras, estando presente nas quatro regiões estudadas. O genótipo P[7] também esteve presente neste Estado, mas em menor proporção (22,5%). No Rio Grande do Sul uma amostra foi caracterizada como P[6] e outra como P[6][7].

Em estudos realizados por GOUVEA, SANTOS e TIMENETSKY (1994a, 1994b) nos Estados Unidos, foram detectados genótipos não usuais de rotavírus suínos, como G6 e G8, associados predominantemente ao genótipo P[7], enquanto o genótipo P[6] foi encontrado misturado com genótipos de amostras bovinas.

Dos trabalhos revisados na literatura brasileira, três publicados mais recentemente, na forma de resumos, no Encontro Nacional de Virologia, realizado em São Lourenço, MG, no mês de novembro de 1998, mereceram destaque, uma vez que assemelham-se ao presente estudo com relação à espécie animal, às técnicas utilizadas, às regiões de onde originaram-se as amostras e aos resultados obtidos.

ALFIERI et al. (1998) analisando amostras de rotavírus suíno do Estado do Paraná, identificaram a ocorrência dos genótipos G5 P[7] e G4 P[6], coincidindo com os resultados obtidos nesta pesquisa, durante o mesmo período.

O relato de LIMA et al. (1998), que também utilizou amostras de suínos do Paraná, mostrou vários genótipos diferentes, e concordando com os resultados do presente estudo, uma vez que foram encontradas duas amostras caracterizadas como G9 P[6]. Além disso, naquele relato constatou-se a ocorrência de uma amostra não usual para suínos que mistura os genótipos G1 de humanos com G5 de suínos, associados ao P[8].

Ainda nessa mesma linha de pesquisa, os resultados de CARUZO et al. (1998), obtidos a partir de amostras do Estado de São Paulo, foram semelhantes aos deste estudo no que se refere aos genótipos G3, G5, G10, P[6] e P[7] encontrados.

Dos trabalhos publicados no Brasil até o presente momento o de CARUZO et al. (1998) foi o que apresentou maiores semelhanças em relação à caracterização dos rotavírus suínos quanto ao subgrupo, descrevendo a ocorrência dos subgrupos II e nãoI-nãoII, na região Sul.

Os resultados apresentados sugerem a existência de importantes diferenças entre as amostras de rotavírus suínos encontradas no Brasil e em outros países, além da suspeita da ocorrência de novos sorotipos de rotavírus suínos, pelo fato de que 22% das amostras analisadas terem apresentado resultados negativos para genótipos G e P, após várias repetições, não sendo identificados pelos *primers* disponíveis até o momento.

Convém ressaltar que, quando são avaliadas as informações provenientes de diversos trabalhos científicos corroborados por pesquisas mais recentes, observa-se que tem sido freqüente a identificação de amostras de rotavírus animais que apresentam sorotipos característicos de humanos e vice-versa. Tal constatação evidencia a ocorrência de recombinação natural e da transmissão de rotavírus entre espécies, cujos indícios também foram descritos neste trabalho.

Convém ressaltar, finalmente, que este estudo foi pioneiro quanto à caracterização sorológica e molecular de rotavírus suíno da região Sul do Brasil, fornecendo novos conhecimentos sobre as características antigênicas dos isolados de campo, para o direcionamento da implementação de medidas de prevenção e controle das diarreias de leitões.

6 CONCLUSÕES

Com a realização deste estudo algumas conclusões podem ser expressas.

Quanto ao objetivo geral do estudo, pode-se afirmar que:

- Foi possível realizar a caracterização sorológica e molecular de rotavírus suíno em 76,27% das amostras analisadas, originárias dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, que constituem a Região Sul do Brasil.

De acordo com os objetivos específicos, verificamos que:

- Foi verificada a ocorrência de rotavírus em suínos de 1 a 60 dias de idade na Região Sul do Brasil, em granjas que apresentavam casos de gastroenterite aguda, sendo as amostras positivas detectadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) em 35,33% do total de animais analisados.
- A caracterização do genoma dos rotavírus identificados por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) revelou a existência de um único eletroferótipo de rotavírus suíno nas regiões estudadas.
- A caracterização sorológica de grupo e subgrupo das amostras de rotavírus revelou a existência do grupo A e dos subgrupos II no Estado do Paraná, e não II no Rio Grande do Sul, Santa Catarina e também no Paraná.
- A caracterização molecular dos genótipos G e P dos rotavírus suínos identificados demonstrou uma diversidade grande de genótipos, incluindo tipos não usuais em suínos como G9P[6], G4G9P[6], G10P[6][7] e G10P[7], ocorrendo junto com outros tipos comuns de rotavírus dentro de uma mesma região e até

da mesma granja. O genótipo G5P[6] foi o mais freqüente, seguido pelo G3P[6][7]. A mistura dos genótipos P[6] e P[7] ocorrendo no mesmo suíno foi observada com certa freqüência, principalmente nas amostras provenientes de Santa Catarina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAH, M.I., ROHWEDDER, A., OLALEYE, O.D., et al. Serotype of nigerian rotavirus strains. **Tropic. Med. Intern. Health**, v.2, n.4, p.363-370, 1997.
- ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., FREITAS, J.C. de, et al. Ocorrência de *Escherichia coli*, rotavirus, picobirnavirus e *Cryptosporidium parvum* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina Ci. Agr.**, Londrina, v.15,n.1,p.5-7, mar.1994.
- ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., RESENDE, M. Ocorrência de rotavírus A e não-A em suínos detectada por ensaios imunoenzimáticos e eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE VIROLOGIA,1,1989, Florianópolis, SC. **Anais ...** Florianópolis: s.ed., n.p.
- ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., RICHTZENHAIN, L.J. et al Characterization of porcine group A rotavirus genotypes by RT-PCR. **Virus: rev. res.**, v.3, p.57, 1998 (suppl.1).
- ALFIERI, A. A., LEITE, J.P.G., ALFIERI, A.F., et al. Characterization of field isolates porcine group C rotaviruses by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide-probe. In: ENCONTRO DE VIROLOGIA, 5, 1995, Ribeirão Preto, SP. **Anais ...** Ribeirão Preto: SBV, 1995. n.p.
- ALFIERI, A.A., BRITO, B.G., ALFIERI, A.F., et al. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região sudoeste do estado do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS,7,1995, Blumenau, SC. **Anais...Concórdia: ABRATES**, 1995a. 204p., p.91.
- ALFIERI, A. A., SILVA, C.A., MÉDICE, K.C., et al. Avaliação da ocorrência de rotavírus suíno associada a frequência de diarreia e a presença de fatores de risco nas fases de maternidade e creche. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7, 1995, Blumenau,SC. **Anais...Concórdia: ABRATES**, 1995b. 204p. p.92.
- ALFIERI, A.A., REZENDE, M., CONTE, L.E., ALFIERI, A.F. Evidências do envolvimento de rotavírus na diarreia do pré e pós desmame dos suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.43, n.4, p.291-300, 1991.
- ALMEIDA, S. Mercado internacional. **An. suinocult. ind.**, v.20, n.130, p.14, dez./jan. 1998.
- ATTI, D.J.I., OJEH, C.K., DUROJAIYE, O.A. Detection on rotavirus antigen in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets in Nigeria. **R. Elev. Med. Vet. Pays-Trop.**, v.42, n.4, p.494-496, 1987.
- BARCELLOS, D.E.S.N., GUIZZARDI, I.I., FALLAVENA, L.C.B. Frequência e causa de diarreias bacterianas em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e

- Missões, Rio Grande do Sul. **Bol. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor**, v.7, p.27-37, 1980.
- BARCELLOS D.E.S.N., STEPAN, A. L. Estudo etiológico de diarréia em leitões recentemente desmamados. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 5, 1991, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Jaboticabal: ABRATES, 1991. 143p. p.60.
- BEARDS, G.M., CAMPBELL, A.D., COTIRREL, N.R., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. **J. Clin. Microbiol.**, v.19, p.248-254, 1984.
- BEARDS, G.M., XU, L., BALLARD, A., et al. A serotype 10 human rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1432-35, 1992.
- BELLINZONI, R.C., BLACKHALL, J.O., MATTION, N.M., et al. Serological characterization of bovine rotaviruses isolated from dairy and beef herds in Argentina. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p.2619-2623, 1989.
- BELLINZONI, R.C., MATTION, N.M., BURRONE, O. et al. Isolation of group A swine rotaviruses displaying atypical electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, p.952-954, 1987.
- BELLINZONI, R.B., MATTION, N.M., MATSON, D.O., et al. Porcine rotaviruses antigenically related to human rotavirus serotypes 1 and 2. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.633-636, 1990.
- BERRIOS, E.P., PINOCHET, V.L., ABALOS, P.P., CUEVAS, P.L. Presence of rotavirus in suckling piglets with acute diarrhoea in Central Chile. **Av. Cienc. Vet.**, v.4, n.2, p.160-163, 1989.
- BISHOP, R.F., DAVIDSON, G.P., HOLMES, I.H., RUCK, B.J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p.1281-1283, 1973.
- BITTENCOURT, M.J., CANDEIAS, J.A.N. Study of rotavirus by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and enzyme immunoassay. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3, 1986, São Lourenço, MG. **Resumos ...**, Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa (OPAS/OMS), 1986. 103 p., p.34.
- BITTENCOURT, M.J., RÁCZ, M. L. Eletrophoretic study of the genome of porcine rotaviruses from São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.**, v.23, n.2, p.149-51, 1992.
- BOHL, E.H. Rotaviral diarrhea in pigs: brief review. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.174, p.613-15, 1979.
- BOHL, E. H., KOHLER, E.M., SAIF, L.J., et al. Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.172, p.458-63, 1978.

- BOHL, E. H., SAIF, L.J., THEIL, K.W., et al. Porcine pararotavirus: detection, differentiation from rotavirus and pathogenesis in gnotobiotic pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v.15, p.312-319, 1982
- BOHL, E. H., THEIL, SAIF, L.J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.19, p.105-111, 1984.
- BOTH, G. W., BELLAMY, A.R., MITCHELL, D.B. Rotaviruses protein structure and function. In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 67-105.
- BRANDT, C.D., KIM, H.W., RODRIGUEZ, W.I., et al. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **J. Clin. Microbiol.**, v.13, p.976-981, 1981.
- BRIDGER, J.C. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotaviruses like particles in the faeces of piglets. **Vet. Rec.**, v.107, p.532-33, 1980.
- BRIDGER, J.C. Novel rotaviruses in animals and man. In: BOCK, G., WHELAN, J., ed. **Novel diarrhoea viruses**. Chinchester, UK: John. Wiley & Sons, 1987. p.5-23.
- BRIDGER, J.C. Porcine rotaviruses and their role in disease. **Pig News Inf.**, v.9, n.1, p.23-26, 1988.
- BRIDGER, J.C., CLARKE, I.A., McCRAE, M.A. Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus. **Infect. Immun.**, v.35, n.3, p.1058-62, 1982.
- BRIDGER, J.C., PEDLEY, S., McCRAE, M.A. Group C rotaviruses in humans. **J. Clin. Microbiol.**, v.23, p.760-63, 1986.
- BRIDGER, J.C., WOODE, G.N. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immuno electron microscopy. **Br. Vet. J.**, v.131, p.528-535, 1975.
- BRITO, B.G. de, FILIPPSEN, L.F., MORES, N., BRENTANO, L., BRITO, M.A.V.P. Etiologia da diarréia de leitões lactentes em granjas suínícolas do sudoeste do Paraná. **Semina Ci. Agr.**, v.16, n.1, p.13-17, 1995.
- BRITO, W.M.E.D. de **Caracterização sorológica e molecular de rotavírus bovino no Estado de Goiás**. São Paulo, 1997. 172 p. Tese (Doutoramento em Ciências: Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1997.

- BROWNING, G.F., CHALMERS, R.M., FITZGERALD, T.A., et al. Rotavirus serotypes G3 predominates in horses. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.59-62, 1992.
- BROWNING, G.F., FITZGERALD, T.A., CHALMERS, R.M., SNODGRASS, D.R. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.2043-2046, 1991.
- BRUSSOW, H., NAKAGOMI, O., GERNA, G., EICHHORN, W. Isolation of a avian-like group A rotavirus from a calf with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.67-73, 1992.
- BUESA, J., COLOMINA, J., RAGA, J., et al. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Res. Virol.**, v.147, p.353-361, 1996.
- CANDEIAS, J.A.N., BALDACCI, E.R., BREVIGLIERI, J.C., et al. Diagnóstico de infecções por rotavírus através da reação de imunofluorescência indireta. **Ver. Microbiol.**, v.11, p.76-78, 1980.
- CANDEIAS, J.A.N., ROSENBERG, C.P., RÁCZ, M.L. Identificação por contraímunoeletroforese de rotavírus em casos de diarréia infantil. **Rev. Saúde Públ.**, v.12, p.99-103, 1978.
- CARUZO, T.A.R., MUNFORD, V., GATTI, M.S.V., RÁCZ, M.L. Subgroup and molecular characterization of genotypes G and P of swine rotaviruses. **Virus: rev. res.**, v.3, p.58, 1998 (suppl.1).
- CIARLET, M., LIPRANDI, F. Serological and genomic characterization of two porcine rotaviruses with serotype G1 specificity. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.269-272, 1994.
- CIARLET, M., LUDERT, J.E., LIPRANDI, F. Comparative aminoacid sequence analyses of the major outer capsid protein (VP7) of porcine rotaviruses with G3 and G5 serotype specificities isolated in Venezuela and Argentina. **Arch. Virol.**, v.140, p.437-451, 1995.
- CONNER, M.E., MATSON, D.O., ESTES, M. K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.285-337.
- CORNAGLIA, E., ELAZHARY, Y., TALBOT, B. Bovine rotavirus type detection by neutralizing monoclonal antibodies. **Arch. Virol.**, v.129, p.243-50, 1993.
- COSTA MENDES, V.M. da, BEER, M. de, PEENZE, I., STEELE, A.D. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.3333-3335, 1993.

- COULSON, B.S. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.1-8, 1993.
- DAGENAIS, L., LANSIVAL, B., PASTORET, P. P., KAECKENBEEK, A. Detection par contre-immuno-electro-osmophorese (CIEOP), des rotavirus dans les matières fécales de veau, après concentration au polyethylene glycol 6000 (PEG 6000). **Ann. Méd. Vet.**, v.124, p.223-227, 1980.
- DAS, B.K., GENTSCH, J.R., CICIRELLO, H.G. et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Dehli, India. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1820-1822, 1994.
- DESSELBERGER, U. Molecular epidemiology of rotaviruses. In: FARTHING, M.J.G., ed. **Viruses and the gut**. London: Swann Press, 1989. p.55-65.
- DRIESEN, S.J., CARLAND, P.G., FAHY, V.A. Studies on pre-weaning piglet diarrhoea. **Austr. Vet. J.**, v.70, n.7, p.259-263, 1993.
- DURIGON, E.L., CANDEIAS, J.A.N., JEREZ, J.A., et al. Comparison of staphylococcal co-agglutination with other assays for diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. **J. Virol. Meth.**, v.35, p.73-79, 1991.
- EL-ASSOULI, S.M. Inter-relationships among subgroups, serotypes and electropherotypes of rotaviruses isolated from humans. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v.14, n.3, p.201-206, 1996.
- ELLENS, D.J., LEEUW, P.W., STRAVER, P.J., VAN BALKEN, J.A. Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigen in calf faeces. **Med. Microbiol. Immunol.** v.166, p.157-163, 1978.
- ESTES, M.K. Advances in molecular biology: impact on rotavirus vaccine development. **J. Infect. Dis.** v.174, p.S37-S46, 1996a. (suppl.1).
- ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N. **Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.2. p.1625-1655.
- ESTES, M.K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.**, v.53, p.410-99, 1989.
- ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y., DIMINOV, D.H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. **Prog. Med. Virol.**, v.29, p.1-22, 1984.
- ESTES, M.K., GRAHAM, D.Y., SMITH, E.M., et al. Rotavirus stability and inactivation. **J. Gen. Virol.**, v.43, p.403-409, 1979.
- ESTES, M.K., PALMER, E.L., OBIJESKI, J.F. Rotaviruses: a review. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.105, p.123-84, 1983.

- FENNER, F. J. Classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, v.7, p.34-6, 1976.
- FITZGERALD, G.R., BARKER, T., WELTER, M. W., WELTER, C.J. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infections agents. **Vet. Med.**, v.83, p.80-86, 1988.
- FITZGERALD, G.R., WELTER, , WELTER, M. W. Evaluating the performance of a porcine rotavirus vaccine. **Vet. Med.**, v.81, p.188-192, 1986.
- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A. S., DAVIES, H., et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v.2, p.61-63, 1974.
- FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H. Virus diarrhoea in foals and other animals. **Vet. Rec.**, v.96, p.477, 1995.
- FLEWETT, T.H., WOODE, G.N. The rotaviruses: brief review. **Arch. Virol.**, v.57, p.1-23, 1978.
- FRANCK, R.I.B., FAUQUET, C.M., KNUDSON, D.L., BROWN, F. Classification and nomenclature of viruses. **Arch. Virol.**, v.127, p.186-199, 1991.
- FREITAS, J.C., ALFIERI, A. A., MULLER, E. E., et al. Ocorrência de *E. coli* e rotavírus nas fezes de leitões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 5, 1991, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Jaboticabal: ABRATES, 1991. 143p., p.61.
- FU, Z.F. Evaluation of a commercial ELISA test for the detection of group A rotavirus in pig faeces. **New Zealand Vet. J.**, v.37, n.1, p.39-40, 1989.
- FU, Z.F., BLACKMORE, D.K., HAMPSON, D.J., WILKS , C.R. Epidemiology of typical and atypical rotavirus infection in New Zealand pigs. **New Zealand Vet. J.**, v.37, n.3, p.102-106, 1989.
- FU, Z.F., HAMPSON, D.J., WILKS , C.R. Transfer of maternal antibody against group A rotavirus from sows to piglets and serological responses following natural infection. **Res. Vet. Sci.**, v.48, p.365-373, 1990.
- GATTI, M.S.V., FERRAZ, M. M. G., RÁCZ, M. L., PESTANA DE CASTRO, A. F. Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhea. **Vet. Microbiol.**, v.37, p.187-190, 1993.
- GATTI, M.S.V., HARA, N. H., FERRAZ, M. M. G., PESTANA DE CASTRO, A. F. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Med. Microbiol. Immunol.**, v.178, p.378-379, 1989.

- GATTI, M.S.V., PESTANA DE CASTRO, A. F., CAMARGO, I. J., HARA, N.H. Incidência de rotavírus em suínos na região de Campinas, São Paulo. **Rev. Microbiol.**, v.19, p.327-32, 1988.
- GATTI, M.S.V., RÁCZ, M. L., HARA, N.H., PESTANA DE CASTRO, A. F. Identificação de rotavírus em suínos com ou sem diarreia no Estado de São Paulo, SP, Brasil. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE VIROLOGIA, 1, 1989a, Florianópolis, SC. **Anais ...** Florianópolis: s. ed., n.p.
- GATTI, M.S.V., RÁCZ, M. L., LEITE, D.S. et al. Rotavírus, vírus RNA bi-segmentado e *Escherichia coli* enterotoxigênica isolados de suínos com e sem diarreia. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE VIROLOGIA, 1, 1989b, Florianópolis, SC. **Anais ...** Florianópolis: s. ed., n.p.
- GELBERG, H. Porcine rotavirus and the problems it causes. **Vet. Med.**, v.84, n.4, p.449-452, 1989.
- GENTSCH, J.R., GLASS, R.I., WOODS, P., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1365-1373, 1992.
- GENTSCH, J. R., WOODS, P., RAMACHANDRAN, M., et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: Implications for vaccine development. **J. Infect. Dis.** v.174, p.530-536, 1996. (suppl. 1).
- GERNA, G., ARISTA, S., PASSARANI, N., et al. Electropherotype heterogeneity within serotypes of human rotavirus strains circulation in Italy. **Arch. Virol.**, v.95, p.129-135, 1987.
- GERNA, G., SARASINI, A., PAREA, M., et. al. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus strains with G6 specificity. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.9-16, 1992.
- GERNA, G., SARASINI, A., ZENTILIN, L., et al. Isolation in Europe of 69M-like (serotype 8) human rotavirus strains with either subgroup I or II specificity and a long RNA electropherotype. **Arch. Virol.**, v.112, p.27-40, 1990
- GEYER, A., SEBATA, T., PEENZE, I., STEELE, A.D. A molecular epidemiological study of porcine rotaviruses. **J. South Afr. Vet. Assoc.**, v.66, n.4, p.202-205, 1995.
- GIROTTTO, A.F., SOBESTIANSKY, J., MORES, N., et al. Custo de um surto de rotavírose em uma granja de suínos. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 10, 1988, Rio de Janeiro, RJ. **Proceedings ...** Concórdia: ABRAVES, EMBRAPA-CNPISA, 1988, p.218.
- GLASS, R.I., LANG, D.R., IVANOFF, B.N., COMPANS, R.W. Introduction: Rotavirus – from basic research to a vaccine. **J. Infect. Dis.**, v.174, p.51-52, 1996 (suppl.1).

- GOMBOLD, J.L., RAMIG, R.F. Genetics of the rotaviruses. In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin, Springer-Verlag, 1994. p.130-77.
- GONZALES, S.A., TOMASINI, L., TORTORICI, M.A., AFFANCHINO, J.L. VP6 from porcine rotavirus strain CN86: aminoacid sequence divergence with conservation of subgroup II specificity. **J. Gen. Virol.**, v.76, p.221-224, 1995.
- GORZIGLIA, M., HOSHINO, Y., NISHIKAWA, K., et al. Comparative sequences analysis of the genomic segment 6 of four rotavirus each with a different subgroup specificity. **J. Gen. Virol.**, v.69, p.1659-1669, 1988.
- GORZIGLIA, M., LARRALDE, G., KAPIKIAN, A.Z., CHANOCK, K.M. Antigenic relationships among human rotaviruses in determined by outer capsid protein VP4. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.87, p.7155-7159, 1990b.
- GORZIGLIA, M., NISHIKAWA, K., HOSHINO, Y., TANIGUCHI, K. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried strain of porcine rotavirus to that asymptomatic human rotavirus strains. **J. Virol.**, v.64, n.1, p.414-418, 1990a.
- GOUVEA, V., RAMIREZ, C., LI, B., SANTOS, N., et al. Restriction endonuclease analysis of the VP7 genes of human and animal rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.917-923, 1993.
- GOUVEA, V., CASTRO, L.D., TIMENETSKY, M.do C.S.T., et al. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1408-1409, 1994.
- GOUVEA, V., GLASS, R.I., WOODS, P., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stools specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.276-282, 1990a.
- GOUVEA, V., HO, M.S., GLASS, R., et al. Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989. **J. Infect. Dis.**, v.162, p.362-367, 1990 b.
- GOUVEA, V., SANTOS, N., TIMENETSKY, M.C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1338-1340, 1994b.
- GOUVEA, V., SANTOS, N., TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1333-1337, 1994a.
- GOUVEA, V., NOZAWA, C.M., ARAÚJO, H. Cell culture propagation of rotavirus from faeces of diarrheic piglets. **Rev. Microbiol.**, v.22, n.2, p.108-111, 1991.
- GREEN, K.Y., HOSHINO, Y., IKEGAMI, N. Sequence analysis of the gene encoding the serotype specific glycoprotein (VP7) of two new human rotavirus serotypes. **Virology**, v.168, p.429-33, 1989.

- GREENBERG, H., McAULIFFE, V., VALDESUSO, J., et al. Serological analysis of the serogroup protein of rotavirus using monoclonal antibodies. **Infect. Immunol.**, v.39, n.1, p.91-99, 1983b.
- GREENBERG, H., VALDESUSO, J., VAN WYK, K., et al. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotaviruses. **J. Virol.**, v.47, p.267-275, 1983a.
- GRICE, A.S., LAMBDEN, P.R., CAUL, E.O., CLARKE, I.N. Sequence conservation of the major outer capsid glycoprotein of human group C rotaviruses. **J. Med. Virol.**, v.44, p.166-171, 1994.
- HALL, G.A., JONES, P.W., MORGAN, J.H. Calf diarrhea. In: ANDREWS, A.H., BLOWEY, R.W., BOYD, H., EDDY, R.G., ed. **Bovine medicine**. Blackhall Scientific Publ., 1992. p.154-180.
- HALL, W. A review of colibacillosis in neonatal swine. **Vet. Med.**, v.4, p.449-452, 1989.
- HERBERT, J.P., CAILLET, R., HACQUARD, B., FORTIER, B. Utilization de la proteine "A" de *Staphylococcus aureus* pour le dépistage des rotavirus dans les selles. **Path. Biol.**, v.29, n.2, p.101-104, 1981.
- HERRING, A.J., INGLIS, N.F., OJEH, C.K., et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrilamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v.16, p.473-477, 1982.
- HOBLET, K.H., SAIF, L.J., KOHLER, E.M., et al. Efficacy of na orally administered modified-live-porcine-origin rotavirus vaccine against postweaning diarrhea in pigs. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.1697-1703, 1986.
- HOLMES, I.H. Rotaviruses. In: JOKLIK, W.K., ed. **The reoviridae**. New York: Plenum Publ., 1983. p.359-423.
- HOSHINO, Y., GORZIGLIA, M., VALDESUSO, J., et al. An equine rotavirus (F1-14 strain) which bears both subgroup I and subgroup II specificities on its VP6. **Virology**, v.157, p.488-496, 1987.
- HOSHINO, Y., KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus antigens. In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.180-227.
- HOSHINO, Y., SAIF, L.J., SERENO, M.M., et al. Infection immunity of piglets to either VP3 or VP7 outer capsid protein confers resistance to challenge with a virulent rotavirus bearing the corresponding antigen. **J. Virol.**, v.62, p.744-748, 1988.

- HOSHINO, Y., SERENO, M.M., MIDTHUN, K., et al. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. **Proc. Nat. Acad. Sci., USA**, v.19, p.33-37, 1985.
- HOULY, C.A.P., UCHOA, M.M.M., ZAIDAN, A.M.E., et al. Electrophoretic study of the genome of human rotavirus from Maceio, Brazil. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.33-37, 1986.
- HOUSE, J.A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agent of animal. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.173, n.5, p.573-576, 1978.
- HUANG, J., NAGESHA, H.S., SNODGRASS, D.R., et al. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.85-92, 1992.
- ISEGAWA, Y., NAKAGOMI, O., BRUSSOW, H., et al. A unique VP4 gene allele carried by na unusual bovine rotavirus strain, 993/83. **Virology**, v.198, p.366-369, 1994.
- ISEGAWA, Y., NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T., et al. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes by polymerase chain reaction. **Mol. Cel. Prob.**, v.7, p.277-284, 1993.
- JANKE, B.H., NELSON, J.K., BENFIELD, D.A., NELSON, E.A. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.2, n.4, p.308-311, 1990.
- JEREZ, J.A., CANDEIAS, J.A.N., RÁCZ, M.L., et al. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarreicas de bezerros. **Rev. Microbiol.**, v.18, p.201-204, 1987.
- JOERGESSEN, P.H., ODIAWO, G.O., HALLIWELL, R.W. Prevalence of porcine rotavirus infection in Zimbabwe. **Zimbabwe Vet. J.**, v.21, n.1, p.9-16, 1990.
- KALICA, A.R., PURCELL, R.H., SERENO, M.M., et al. Microtiter solid phase radioimmunoassay for detection of the human reovirus-like agent in stool. **J. Immunol.**, v.118, p.1275-1279, 1977.
- KALICA, A.P., SERENO, M.M., WYATT, R.G., et al. Comparison of human and animal rotaviruses strain by gel electrophoresis of viral RNA. **Virology**, v.125, p.194-205, 1978.
- KAMINJOLO, J.S., ADESIYUM, A.A. Rotavirus in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. **Br. Vet. J.**, v.150, n.3, p.293-299, 1994.
- KANG, S.Y., NAGARAJA, K.V., NEWMAN, J. A rapid coagglutination test for detection of rotaviruses in turkey. **Avian Dis.**, v.29, n.3, p.640-648, 1984.

- KAPAHUKE, R., RAPPOLD, W., DESSELBERGER, U., et al. The stiffness of dsRNA: Hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. **Nucleic Acids Res.**, v.14, p.3215-3228, 1986.
- KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: FIELDS, B.N. **Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v.2. p.1657- 1708.
- KAPIKIAN, A.Z., CLINE, W.L., GREENBERG, H.B., et al. Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immuno adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. **Infect. Immun.**, v.33, p.415-425,1981.
- KASSUBA, A., SAIF, L.J., GREENBERG, H.B. Subgroup classification of porcine group-A rotaviruses, using monoclonal antibodies in a enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, p.938-944,1990.
- KROEFF, S.S., MUNFORD, V., CARUZO, T.A.R., RÁCZ, M.L. Serological and molecular characterization of swine rotavirus from South Region of Brazil. **Virus: rev. res.**, v.3, p.58, 1998 (suppl.1).
- LECCE, J.G., BALSBAUGH, R.K., CLARE, D.A., KING, N.W. Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weaning diarrhea of pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v.16, p.715-723, 1982.
- LECCE, L.G., BALSBAUGH, R., KING, M.W. Rotavirus, enterotoxigenic hemolytic *Escherichia coli* and management in piglets weaning diarrhea. **J. An. Sci.**, v.53, p.187, 1981.
- LEITE, J. P. G., ALFIERI, A., A., WOODS, P.A., et al. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: Characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch. Virol.** v.141, p.2365-2374, 1996.
- LEMAN, A. D., GLOCK, R. D., MENGELING, W. L., et al . **Diseases of swine**. 6.ed. Ames: Iowa State University Press, 1986. 832 p.
- LIMA, R.C.C., NOZAWA, C.M., LINHARES, R.E.C. et al. Diversity of porcine rotavirus in Parana. **Virus: rev. res.**, v.3, p.59, 1998 (suppl.1).
- LIPRANDI, F., LOPEZ, G., RODRIGUEZ, I., et al. Monoclonal antibodies to the VP6 of porcine subgroup I rotaviruses reactive with subgroup I and non-subgroup II strains. **J. Gen. Virol.**, v.71, p.1395-1398, 1990.
- LOPEZ, G, DESSELBERG, U., McCRAE, M.A. The rotavirus genome In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.9-29.
- LOURENÇO, M.H., NICOLAS, J.C., COHEN, J., et al. Study of human rotavirus genome by electrophoresis attempt of classification among strains isolated in France. **Ann. Virol. (Inst. Pasteur)**, v.132E, p.161-173, 1981.

- MADEC, F., JOSSE, J., JESTIN, A. Les diarrhées blanches du porcelet sous la mère. I étude écopathologique dans les élevages de Bretagne. **Rec. Méd. Vét.**, v.162, p.1087-1093, 1986.
- MAGAR, R., ROBINSON, Y., MORIN, M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of pre-weaning and post-weaning diarrhea in Quebec swine herds. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, n.3, p.260-263, 1991.
- MARCANDO passo. **An. suinocult. ind.**, v.20, n.130, p.12-13,dez./jan. 1998.
- MARKOWSKA, D.I., WINIARCZYK, S., GRADZKI, Z., PEJSKAK, K. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Imm. Microb. Infect. Dis.**, v.19, p.219-232, 1996.
- MATSUI, S.M., MACKOW, E.R., GREENBERG, H. B. Molecular determinant of rotavirus neutralization and protection. **Adv. Vir. Res.**, v.36, p.181-214, 1989.
- MATTION, N.M., BELLINZONI, R.C., BACKWALL, J.O. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p.795-798, 1989.
- McCRAE, M.A. Nucleic acid-based analyses of non-group A rotavirus. In: **Novel diarrhoea viruses**. Chinchester, U.K., John, Wiley & Sons, 1987.p.24-48.
- McNULTY, M.S. Rotaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.40, p.1-18, 1978.
- MEBUS, C.A. Rotavirus and coronavirus diseases of animal in the Americas. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE O IMPACTO DE DOENÇAS VIRAIS NO DESENVOLVIMENTO DOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS E DA REUNIÃO DO CARIBE, 1, Rio de Janeiro, RJ, 1982. **Anais ...**, Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1982, v.1, p.185-190.
- MORES, N., SOBESTIANSKY, J., CIACCI, J dos R., et al. **Fatores de risco na maternidade associados a diarréia, mortalidade e baixo desempenho dos leitões**. Concórdia, SC: EMBRAPA/CNPISA, 1991. 5p. (Comunicado Técnico, 178).
- MORES, N., SOBESTIANSKY, J., VIEIRA, R.P., et al. Estudo ecopatológico sobre problemas em leitões lactentes em criações no sul do Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.**, v.47, p.549-559, 1995.
- MORILLA, A.G., ARRIAGA, C.D., RUIZ, A.M., et al. Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical group B to E rotaviruses in suckling pigs. **Ann. Rech. Vet.**, v.22, p.193-200, 1991.
- MORIN, M., MAGAR, R., ROBINSON, Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herds. **Can. J. Vet. Res.**, v.54, p.385-389, 1990.

- MUNFORD, V. **Cultivo e caracterização sorológica de rotavírus bovinos no Estado de São Paulo**. São Paulo, 1995. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1995.
- MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. **Arch. Virol.**, v.131, p.208-239, 1995. (suppl.10).
- NAGESHA, H.S., HOLMES, I.H. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, p.171-174, 1988.
- NAGESHA, H.S., HUM, C.P., BRIDGER, J.C., HOLMES, I.H. Atypical rotaviruses in australian pigs. **Arch. Virol.**, v.102, p.91-98, 1988.
- NAGESHA, H.S., HOLMES, I.H. Direct serotyping of porcine rotaviruses using VP7-specific monoclonal antibodies by an enzyme immunoassay. **J. Med. Virol.**, v.35, p.206-211, 1991.
- OFFIT, P.A., BLAVAT, G., GREENBERG, H.B., CLARK, H.F. Molecular basis of rotaviruses virulence: role of genetic segment 4. **J. Virol.**, v.57, n.1, p.46-49, 1986.
- PALOMBO, E.A., BISHOP, R.F., COTTON, R.G.H. Sequence conservation within neutralization epitope regions of VP7 and VP4 proteins of human serotype G4 rotavirus isolates. **Arch. Virol.**, v.133, p.323-334, 1993.
- PAUL, P.S., LYOO, Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Vet. Microbiol.**, v.37, p.299-317, 1993.
- PEDLEY, S., BRIDGER, J.C., BROWN, J.F., McCRAE, M.A. Molecular characterization of rotavirus with distinct group antigens. **J. Gen. Virol.**, v.64, p.2093-2101, 1983.
- PEDLEY, S., BRIDGER, J.C., CHASEY, D., McCRAE, M.A. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.67, p.131-137, 1986.
- PEREIRA, H.G., AZEREDO, R.S., LEITE, J.P.G., et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. **J. Virol. Meth.**, v.10, p.21-28, 1985.
- PEREIRA, H.G., AZEREDO, J.S., LEITE, J.P.G., et al. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Para, Brasil. **J. Hyg.**, v.90, p.117-125, 1983.
- PHILLIPS, A.D. Mechanisms of mucosal injury: human studies. In: FARTHING, M.J.G., ed. **Viruses and the gut**. London, Swan Press, 1989. p. 30-40.

- PHILLIPS, A.D. Small intestinal mucosa in childhood in health and disease. **Scand. J. Gastroenterol.**, v.16, p.65-85, 1981.
- PONGSUWANNA, Y., TANIGUCHI, K., CHIWAKUL, M., et al. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.1050-1057, 1996.
- PORTERFIELD, J.S. Reoviridae. In: - **Andrewes' viruses of vertebrates**. London. Bailliere Tindall, 1989, p.146-165.
- PRASAD, B.V.V., CHIU, W. Structure of rotavirus. In: RAMIG, R.F., ed. **Rotaviruses**. Berlin, Springer-Verlag, 1994. p.9-29
- PUERTO, S.M., POLANCO, G.G., GONZALEZ, L.M.R., et al. Classification of the rotaviruses isolated from pig farms in the state of Yucatán, Mexico. **Vet. Mexico**, v.27, n.1, p.29-32, 1996.
- RÁCZ, M.L., MUNFORD, V., FERNANDES, M.J.B., KROEFF, S.S., KOTAIT, I. Identification, propagation and subgroup characterization of equine rotavirus isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Microbiol.**, v.24, p.161-165, 1993.
- RAMACHANDRAN, M., DAS, B.K., VIJ, AARTI, et al. Unusual diversity of human rotavirus G and P genotypes in India. **J. Clin. Microb.**, v.34, p.436-439, 1996.
- RODGER, S.M., BISHOP, R.F., BIRCH, C., et al. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. **J. Clin. Microbiol.**, v.13, p.272-278, 1981.
- ROEHE, P.M., MARTINS, R.M., BANGEL, E., BARCELLOS, D.E.S.N. Ocorrência de rotavírus em granjas de suínos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1, e CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2, 1985, Rio de Janeiro, RJ. **Anais ...** Concórdia: EMBRAPA/CNPISA, 1985. 148 p. p.123.
- ROEHE, P.M., MARTINS, R.M., CUNHA, A.C., OLIVEIRA, L.G. Identification of rotavirus in faeces of swine in the state of Rio Grande do Sul. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3, 1986, São Lourenço, MG. **Resumos ...**, Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa (OPAS/OMS), 1986. 103p. p.30-31.
- RUIZ, A.M., ARRIAGA, C.D., MORILLA, A.G. Rotavirus and pararotavirus associated with diarrhoea in piglets in Mexico. **Ver. Latinoam. Microb.**, v.32, n.2, p.153-156, 1990.

- RUIZ, A.M., LÓPEZ, I.V., LÓPEZ, S., et al. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus type. **J. Virol.** v.62, p.4331-4336, 1988.
- SAIF, L.J. Comparative aspects of enteric viral infections. In: SAIF, L.J., THEIL, K.W., ed. **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 1990. p.9-31.
- SAIF, L.J. Nongroup A rotaviruses. In: SAIF, L.J., THEIL, K.W., ed. **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 1989. p.73-95.
- SAIF, L.J. Passive immunity to coronavirus and rotavirus infections in swine and cattle: enhancement by maternal vaccination. In: TZIPORI, S., ed. **Infectious diarrhea in the young**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.456-467.
- SAIF, L.J., BOHL, E.H., THEIL, K.W., et al. Rotavirus-like, calicivirus-like and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **J. Clin. Microbiol.**, p.105-111, 1980.
- SAIF, L.J., FERNANDEZ, F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. **J. Infect. Dis.** v.174, p.S98-106, 1996 (suppl.1).
- SAIF, L. J., JACKWOOD, D.J. Enteric virus vaccines: theoretical considerations, current status and future approaches. In: SAIF, L.J., THEIL, K.W., Ed. **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990, p.313-329
- SAIF, L.J., JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: **Rotaviruses**. RAMIG, R. F., ed. Berlin: Springer – Verlag, 1994. p.340-371.
- SAIF, L.J., ROSSEN, B., PARWANI, A. Animal rotaviruses. In: KAPIKIAN, A.Z., ed. **Virus infections of the gastrointestinal tract**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994, p.279-367.
- SAIF, L.J., THEIL, K.W. Antigenically distinct rotaviruses of human and animal origin. In: TZIPORI, S., ed. **Infectious diarrhea in the young**. Amsterdam: Elsevier, 1985. p.208-214.
- SAN JUAN, C.S. de, BELLINZONI, R.C., MATTION, N., et al. Incidence of group A and atypical rotaviruses in brazilian pig herds. **Res. Vet. Med.**, v.41, p.270-272, 1986.
- SAN JUAN, C.S. de , WAACK, R.S., BELLINZONI, R., SCODELLER, E.A. Ocorrência de rotavirose em leitões em rebanhos da região leste do estado de São Paulo. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 1, e CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 2, 1985, Rio de Janeiro, RJ. **Anais ...** Concórdia: EMBRAPA/CNPISA, 1985. 148 p. p.135.

- SANEKATA, T., KISHIMOTO, E., SATO, K., et al. Detection of porcine rotavirus in stools by a latex agglutination test. **Vet. Microb.**, v.27, p.245-251, 1991.
- SESTAK, K., MUSILOVA, J. Isolation of rotavirus strains from naturally infected piglets. **Acta Virol.**, v.38, p.27-30, 1994.
- SNODGRASS, D.R. Calf scour. **News Sheet**, v.2, n.9, p.2-6, 1995.
- SNODGRASS, D.R., HERRING, A.J., CAMPBELL, J.M., et al. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and men. **J. Gen. Virol.**, v.65, p.909-914, 1984b.
- SNODGRASS, D.R., OJEH, C.K., CAMPBELL, I, HERRING, A.J. Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. **J. Clin. Microbiol.**, v.20, p.342-346, 1984a.
- SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D., MORES, N., et al. **Patologia e clínica suína**. [s.l.]: ABRATES, 1993. 350 p. p.245-248.
- SORRENTINO, A., SCODELER, E.A., BELLINZONI, R. et al. Detection of na atypical rotavirus associated with diarrhoea in Chaco, Argentina. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.80, p.120-122, 1986.
- STEELE, A.D., KASOLO, F.C., BOS, P., et al. Characterization of VP6 subgroup, VP7 and VP4 genotype of rotaviruses strains in Lusaka, Zambia. **Ann. Trop. Paediatric**, v.18, p.111-116, 1998.
- SUZUKI, H., KONNO, T. Reovirus-like particles in jejunal mucosa of a japanese infant with acute infectious non-bacterial gastroenteritis. **Tohoku J. Exp. Med.**, v.115, p.199-211, 1975.
- SVENSMARK, B., NIELSEN, K., DALSGAARD, K., WILLENBERG, P. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed danish sow herds, III: Rotavirus infection. **Acta Vet. Scand.**, v.30, n.1, p.63-70, 1989a.
- SVENSMARK, B., NIELSEN, K., WILLENBERG, P., JORSAL, S.E. Epidemiological studies of piglet diarrhoea in intensively managed danish sow herds, II: Post-weaning diarrhoea. **Acta Vet. Scand.**, v.30, n.1, p.55-62, 1989b.
- TANIGUCHI, K., URASAWA, T., MORITA, Y., et al. Serotyping of human rotavirus in stools by na enzyme-linked immunosorbent assay using serotype 1,2,3 and 4 specific monoclonal antibodies to VP7. **J. Infect. Dis.**, v.155, p.1159-1166, 1987.
- TANIGUCHI, K., URASAWA, S., URASAWA, T. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.1045-1053, 1985.

- TANIGUCHI, K., URASAWA, T., URASAWA, S., YASUHARA, T. Production of subgroup-specific monoclonal antibodies against human rotaviruses and their application to an enzyme-linked immunosorbent assay for subgroup determination. **J. Med. Virol.**, v.14, p.115-125, 1984.
- THEIL, K.W. Group A rotaviruses. In: SAIF, L.J., THEIL, K.W., ed. **Viral diarrheas of man and animals**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p.279-367.
- THEIL, K.W., SAIF, L.J., NOORHEAD, P.D., WHITMOYER, R.E. Porcine rotavirus-like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. **J. Clin. Microbiol.**, v.21, p.340-345, 1985.
- TERRETT, L.A., SAIF, L.J., THEIL, K.W., et al. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, p.268-272, 1987.
- TIMENETSKY, M. do C.S.T., GOUVEA, V., SANTOS, N. et al. A novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. **J. Gen. Virol.**, v.78, p.1373-1378, 1997.
- TIMENETSKY, M. do C.S.T., SANTOS, N., GOUVEA, V. Survey of rotavirus G and P types associated with human gastroenteritis in São Paulo, Brasil, from 1986 to 1992. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2622-2624, 1994.
- TODD, D., McNULTY, M.S. Characterization of pig rotavirus RNA. **J. Gen. Virol.**, v.33, p.147-150, 1976.
- TSUNEMITSU, H., JIANG, B., SAIF, L.J. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assays. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.2129-2134, 1992.
- TZIPORI, S., CHANDLER, D., SMITH, M., et al. Factors contributing to postweaning diarrhoea in a large intensive piggyery. **Aust. Vet. J.**, v.56, p.274-278, 1980.
- URASAWA, S.A., HASEGAWA, A., URASAWA, T., et al. Antigenic and genetic analyses of human rotaviruses in Chiang Mai, Thailand: evidence for a close relationship between human and animal rotaviruses. **J. Infect. Dis.**, v.166, p.227-234, 1992.
- URASAWA, S.A., URASAWA, T., TANIGUCHI, K., et al. Survey of human rotavirus serotypes in different localities in Japan by enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. **J. Infect. Dis.**, v.160, p.44-51, 1989.
- USHIJIMA, H., KOIKE, H., MUKOYAMA, A., et al. Detection and serotyping of rotaviruses in stool specimens by using reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. **J. Med. Virol.**, v.38, p.292-297, 1992.

- UTRERA, V., MAZZALI, D.E., GORZIGLIA, M., ESPARZA, J. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. **Res. Vet. Sc.**, v.36, p.310-315, 1984
- WELTER, M.W., WELTER, C.J. Evaluation of killed and modified live porcine rotavirus vaccines in cesarean-derived colostrum-deprived pigs. **Vet. Microbiol.**, v.22, p.179-186, 1990.
- WENTZ, I., MORES, N., SOBESTIANSKY, J., et al. Agentes infecciosos envolvidos com diarreia em leitões lactentes. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 10, 1988, Rio de Janeiro. **Proceedings ...** Concórdia: EMBRAPA-CNPQA, 1988. p.136.
- WESTERCAMP, D.H. Field trial of porcine rotavirus vaccine to combat post-weaning scours in baby pigs. **Med. Vet. Practice**, v.67, p.17-18, 1986.
- WHITE, L., GARCIA, D., BOHER, Y., et al. Temporal distribution of human rotavirus serotypes 1,2,3 and 4 in venezuelan children with gastroenteritis during 1979-1989. **J. Med. Virol.**, v.34, p.79-84, 1991.
- WILDE, J., EIDEN, J., YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v.28, p.1300-1307, 1990.
- WILL, L.A., PAUL, P.J., PROESCHOLDT, T.A., et al. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.6, n.4, p.416-422, 1994.
- WOODE, G.N. Porcine rotavirus infection. In: LEMAN, A.D., STRAW, B., GLOCK, R.D. et al. **Disease of swine**. 6.ed.. Ames: Iowa State University Press, 1986. 832 p., p.268-282.
- WOODE, G.N., BRIDGER, J., HALL, G.A., et al. The isolation of reovirus-like agents (rotavirus) from acute gastroenteritis of piglets. **J. Med. Virol.**, v.9, p.203-209, 1975.
- WOODE, G.N., BRIDGER, J.C., JONES, J.N., et al. Morphological and antigenic relationship between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. **Infect. Immun.**, v.14, p.804-810, 1976.
- XU, L., HARBOUR, D., McCRAE, M.A. The application of polymerase chain reaction to detection of rotavirus in faeces. **J. Virol. Meth.**, v.27, p.29-38, 1990.
- YEAGER, M., BERRIMAN, J.A., BAKER, T.S., BELLAMY, A.R. Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. **Embo. J.**, v.13, p.1011-1018, 1994.

YOLKEN, R.H., BARBOUR, B.A., WYATT, R.G., KAPIKIAN, A. Z. Immune response to rotaviral infection – measurement by enzyme immunoassay. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.173, n.5, p.551-554, 1978.